

## \* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

### [Detailed Description of the Invention]

The name variation of an invention and detection of polymorphism, refining of the amplified DNA sample, And this invention in the field of the background art field molecular biology of the use invention of fixed mismatch binding protein for identification of allele, and medicine, It is related with the method for removing mismatch content DNA from the unit of amplified DNA about the method for detecting the variation containing a slight variation about a little salt group conversion in wild strain DNA, addition of a little salt group, or deletion.

Depending on detection that the polymorphism of variation and a sequence of development of a technological background Homo sapiens molecule and medical genetics is effective, and exact, these large majorities are produced from the substitution of a little salt group and small addition, or deletion. The assay which can detect a specific variation in a sample or existence of a variation nucleic acid sequence is intrinsically [ because of sick precognition and diagnosis, legal medicine, epidemiology, and public health ] important. Such assay detects existence of the mutant allele in an individual, and may be used for this individual judging a possibility that it will suffer from the hereditary disease, for example. Discovery that each variation in the oncogene of a cell can cause activation of the oncogene which draws the transformation to a cancer cell from a cell (Cancer Nishimura, S.et al., Biochem.J.243:313-327(1987);Bos, J.L.) In connection with Res.49:4682-4689 (1989), the capability to detect variation in the point of discovery of the susceptibility over early detection or cancer of cancer is increasing importance.

The demand that you want to increase the availability and application possibility of such assay is often troubled by the complexity and cost besides sensitivity of assay. Therefore, the more highly sensitive thing for detection of change (alteration) of DNA for which cheap assay is developed relatively simply is demanded strongly.

a group of nucleic acid molecules, such as susceptibility over decomposition according [ nucleic acid deletion assay ] to size, a sequence, and restriction endonuclease, — it can be based on either of the characteristics. It may be increased by the sensitivity of such assay by changing the form with which a detecting signal is reported or a signal is sent to an observer. Thus, using the reagent by which the sign was carried out, can make it increase so that it may be detected, for example, and the sensitivity of assay as this sign, An enzyme (Kourilsky et al. and U.S.Patent 4,581,333), Radioisotope (Falkow, et al., U.S.Patent 4,358,535;Berninger, U.S.Patent 4,446,237), Fluorescent labeling (Albarella et al., EP 144914), There are a chemicals sign (Sheldon III et al., U.S.Patent 4,582,789; Albarella et al., and U.S.Patent 4,563,417), a modified base (Miyoshi et al., EP 119448), etc.

Most methods of planning the trial of detection of the genetic alteration which consists of one or several sorts of bases are methods containing the hybridization as which standard nucleic acid

(DNA or RNA) and the variation between test DNA and \*\* are expressed as a base of the incorrect pair in a heteroduplex, or the azygos. Detection of the base of these incorrect pairs or the azygos is attained by various methods. A mismatch, On the other hand, the double strand in the part of a mismatch with or the enzyme (RNaseA, MutY) which cuts both chains. It is detected (R.M.et Myers). al. and Cold Spring Harbor. Symp.Quant.Biol.51:275-284 (1986); Gibbs, R.et al., Science 236:303-305 (1987); Lu, A.S.et al., 1992, Genomics 14:249-255 (1992). The double strand without a mismatch is not cut. When variation exists in test DNA by carrying out annealing to test DNA using the nucleic acid fragmentation by which the sign was carried out by radioactivity, it is possible to produce the fragmentation of specific size using these enzymes. This fragmentation is distinguished from the fragmentation which is not cut by polyacrylamide gel electrophoresis. As for the main problems of these methods, these need use of RNA (the RNase method).

It is what (the MutY method) only a restricted number of mismatches are [ a thing ] detectable. Mismatch content DNA duplex is distinguished from the double strand which matched thoroughly also by denatured gel electrophoresis. in this system, since the polyacrylamide gel top of denaturation inclination is moved to a double strand under the conditions on which mismatch content DNA denaturalizes more easily than a homologous double strand without a mismatch, these 2 kind double strands differ -- distance movement is carried out. This method that sensitivity is high and exact requires time and effort extremely, and requires the technical complexity of a high level.

Other two methods of variation detection are based on extension of the fragmentation of DNA in case a mismatch exists, or lack of junction. When it requires that the standard DNA oligonucleotide correctly ended in the mutation site in question should both be used for law and annealing is carried out to test DNA, the portion of a mismatch serves as the last base of said oligonucleotide. Lack of the capability of the DNA polymerase which expands the oligonucleotide in which mismatch detection has (a) mismatch end base, Or it depends for whether being lack of the capability of the DNA ligase to which this 2 \*\* oligonucleotide in case a mismatch is in the joined part between (b)2 \*\* oligonucleotides is joined, and \*\*\*\*\*. The length of fragmentation is determined by gel electrophoresis. An existence of fragmentation longer than an input oligonucleotide shows that a mismatch, for example, variation, does not exist in test DNA. these methods -- a little -- or -- time and effort is taken and it needs to know the exact position of variation, and an interpretation becomes difficult when sample DNA is the heterozygote about the variation in question. Therefore, these are not practical although used for screening polymorphism.

The chemical method of cutting of DNA with a mismatch (Nuc.Acids cotton, R.G.et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:4397-4401(1988);Cotton, R.G.) Res 17:4223-4233 (1989) is based on chemical cutting in the mismatch site of a terrorism double strand to DNA-DNA which used several sorts of drugs especially osmium(VIII) oxide, and hydroxylamine. In this method, a DNA probe is prepared by restriction enzyme cutting of DNA of concern. Hybridization of the plasmid DNA containing the sequence of concern is carried out to the probe DNA by which the sign (the sign was carried out or the sign of the end was carried out to the inside by <sup>32</sup>P) was carried out. ; to which hydroxylamine carries out chemical modification of the cytosine of a mismatch -- osmium(VIII) oxide embellishes thymine of a mismatch. Then, in order to cut DNA in an ornamentation part using piperidine, next to identify a cutting product, polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and autoradiography are performed. It is said that this method has the advantage of detecting all the possible a little salt group pairs. It is because this method also produces cutting in the base pair [ / near the mismatch ] which matched as a result.

The publication before examination of the laboratory of a dregs key (the [ Caskey, C.T.et al., / European patent publication-before-examination ] 333,465(9/20/89); Grompe, M et al., and Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:5888-5892 (1989))

The method of localizing the variation which uses cDNA amplified by PCR as a template for \*\* and a mismatch cutting reaction is indicated. This art was successfully applied to studying an ornithine-transcarbamoylase (OTCase) deletion patient, in order to determine the position of variation. Kun and others (Kung et al., U.S. Pat. No. 4,963,658 gazette), itself indicates detection of ssDNA by combination with single stranded DNA (ssDNA) binding protein of high affinity combinable with a sign like beta-D-galactosidase like topoisomerase or DNA unwinding protein.

The family of the protein containing the protein called mismatch binding protein (MBP) which recognizes mismatch content DNA and is combined with this is used for a mismatch repair system and a mismatch binding protein DNA mismatch repair system. As a paper, Radman and M.et. al. and Annu.Rev.Genet.20:523-538. (1986); refer to Radman, M.et al., Sci.Amer., August 1988, pp.40-46;Modrich, P., and J.Biol.Chem.264:6597-6600 (1989). MutS protein was identified as an ingredient of an Escherichia coli mismatch repair system. For example, Lahue, R.S.et al., and Science. 245:160-164(1988); Jiricny, J.et al., and Nucl.Acids Res.16:7843-7853(1988); Su, S.S.et al., and J.Biol.Chem.263:6829-6835(1988);. Lahue, R.S.et al., Mutat.Res.198:37-43(1988);Dohet, C.et al., and Mol.Gen.Genet.206:181-184(1987); and Jones, and M.et. Refer to al. and Genetics 115:605-610 (1987). MutS of Salmonella typhimurium (J.Bacteriol.170:197-202(1988); Lu, A.L.et al., and Genetics 118:593-600(1988); Haber L.T.et al.) Pang,P.P.et al.,J.Bacteriol.163:1007-1015(1985))

And in other bacteria kinds containing the hexA protein (Priebe S.D.et al., J.Bacteriol.170:190-196(1988); Haber et al., above-shown) of Streptococcus pneumoniae, Albuminoid is publicly known.

Although the refined MutS protein is combined with DNA containing an incorrect opposite base, it does not combine with DNA without a mismatch, or DNA of a single strand. A MutS-DNA interaction does not produce any decomposition or ornamentation of DNA, either. There is no above-mentioned reference which indicates a possibility of using MBP MBP(ed) or fixed for the purpose of removing DNA of a mismatch from the amplified DNA sample as a part of variation detection assay.

The outline this invention person of an invention (1) gene mutation or detection of the polymorphism of a genome, (2). It is because the sequence currently polluted or the sequence including an error introduced in the amplification process is removed. It devised about use of the mismatch binding protein in which the identification [ of the specific allele in refining of the amplified DNA sample and (3) multiple-alleles system ] and \*\* sake was fixed (MBP), for example, the MutS protein of Escherichia coli.

It can be obtained from any [ the nucleic acid analyzed from a blood cell, a tumor tissue, the cell under culture, and any other sauce including any organization, and / which can obtain DNA preferably and contain Homo sapiens ] kind. The sign of the DNA can be carried out by all of publicly known various methods using colorimetry, chemicals coloring, or a radioactivity marker. In practice, there is no necessity of carrying out the sign of the test DNA.

In order to detect variation and polymorphism, it can assay with the competitive oligonucleotide by which the sign was carried out. A sign is unnecessary in order to refine amplified DNA. For identification of allele, a sign is required in the compounded single strand oligonucleotide probe. The method of this invention denatures test DNA and is based on generating of the mismatch in test DNA expressed by carrying out re-annealing of it. When testing heterozygosity or polymorphism in a test DNA sample and a single strand carries out re-annealing to the chain of other parent chromosome origin, self-annealing of this test DNA is only carried out, and it can serve as a gestalt of a mismatch. The mismatch will not be formed if a hetero-junction does not exist. In this case, a sign can be performed in the primer used in amplification, and if amplification is not required, a sign can be added to the end of test DNA.

In order to remove a sequence including the error introduced between amplification of the

sequence kind of DNA or the amount of small number, the same procedure and a sign scheme are used. The materials which are not combined with MBP in these cases are collected, and contain only a double strand sequence without a mismatch. therefore, these sequences can be set into the amplified group (population) -- many sequences of quantity (majority) are extremely made abundant.

The sequence which, on the other hand, includes the error introduced in amplification including the sequence as the charge of a start material in which the material which is not combined is the same when the charge of a start material contains only one sequence forms the mismatch held by fixed MBP, as long as it is comparatively rare.

In order to detect the variation of a homozygote, it is required under existence of the sequence of a publicly known wild strain to carry out annealing to test DNA. Such a sequence may be manufactured between amplification by being compounded artificially or adding the sequence of a publicly known wild strain in the charge of a start material before amplification. When performing annealing under existence of the sequence of a publicly known wild strain, assay detects the variation of a homozygote and heterozygote.

It is necessary to add after amplification the probe DNA of the single strand by which the sign was carried out to test DNA for identification of allele. The sequence of said probe needs to be the same as that of allele so that a mismatch may not be formed, when carrying out annealing to DNA of this allele of concern. The sequence of a probe is chosen so that a mismatch may be formed, even when annealing is carried out to DNA of other arbitrary alleles. Annealing of the test DNA is carried out to such (as an excessive amount to which annealing of the test DNA is carried out so that all probe sequences may form a double strand) a probe. When put to an excessive amount of fixed MBP(s), existence of the sign which has not been combined shows that the allele in question exists in a test DNA sample.

Thus, this invention about the target polynucleotide in a sample, and the method of detecting variation from the non-varying sequence of DNA preferably this method, (a) In the bottom of the condition which a mismatch content polynucleotide molecule combines with the fixed protein, The polynucleotide or the oligonucleotide the sign of the detection of sample origin of was made possible, The fixed mismatch binding protein is incubated, (b) it includes detecting combination of one mismatch (any) content polynucleotide of the sample origins to mismatch binding protein -- thereby, It combines with mismatch binding protein and the existence of polynucleotide or an oligonucleotide the sign of the detection of was made possible shows the variation in the sequence of target polynucleotide.

Provide this invention again and the method of detecting variation from the non-varying sequence of the target mammals polynucleotide of the double strand in a sample this method, (a) Carry out re-annealing of the DNA strand after denaturing the double strand (any) polynucleotide of either of the samples (single strand-ized denature), (b) Preliminary incubation of both bottoms of existence of the mismatch content oligonucleotide the sign of the detection of was made possible or (ii)s MBP combinable with (i) MBP is carried out.

The double strand nucleotide in either under the conditions of being combined with the mismatch content oligonucleotide the sign of the detection of was made possible by which the step (a) denaturalized and re-annealing was carried out, Both the mismatch binding protein fixed on solid support is incubated, (c) Detect the quantity of the mismatch content oligonucleotide the sign of the detection of was made possible combined with mismatch binding protein, It contains, By this, Existence of the variation in the mammals polynucleotide of the double strand of a sample produces the reduction of combination of an oligonucleotide (mismatch content) the sign of said detection of was made possible to mismatch binding protein.

In an above-mentioned method, desirable MBP is Escherichia coli MutS protein or its functional derivative.

As a desirable base material with which mismatch binding protein is fixed, although not limited to this, there are ornamentation cellulose, polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, polyacrylamide, and agarose. The most desirable solid support is a nitrocellulose membrane.

In an above-mentioned method, the sign in which the desirable detection for Polly or the oligonucleotide the sign of the detection of was made possible is possible is biotin.

Provide this invention and the method for removing a sequence including the sequence of the amount of small number or error introduced between amplification processes from the amplified DNA sample this method, (a) Put amplified DNA on denaturation conditions, and rank second, and perform re-annealing so that the sequence or error content sequence of the amount of small number may form mismatch content DNA duplex, The mixture containing the double strand of a mismatch is manufactured, So that (b) mismatch content double strand may combine with MBP, The mixture of a step (a), and the fixed mismatch binding protein, \*\* — incubating — and — it includes removing fixed MBP which mismatch content DNA has combined from the DNA sample by which (c) amplification was carried out — this removes a sequence including a sequence error It is considered as the feature.

As other gestalten, provide the method of identifying specific allele, in the multiple-alleles system in the sample of amplified DNA, and this method, (a) Under a denaturation condition, mix an excessive amount of amplified test DNAs, and the oligonucleotide probe the sign of the completely complementary detection of was made possible to the DNA sequence of specific allele, and rank second, Annealing is carried out so that each duplicate of denaturation and the account probe of back to front which carried out annealing may be found out in double stranded DNA, (b) So that it may be held on MBP by which all mismatch content DNA was fixed, Both an excessive amount of fixed MBP(s) and the mixture of a step (a) are incubated, (c) Remove said fixed MBP which has been combined with one of mismatch (any) content DNAs from amplified test DNA, in the sample from which MBP by which (d) immobilization was carried out was removed, Existence of an implication and DNA to which the sign of [ in said sample ] was carried out by this shows a completely complementary thing to allele [ in / for detecting the existence of a probe the sign of the detection of was made possible / in said probe / said test DNA ].

Fixed MBP in an above-mentioned method, (a) It is a gestalt which can be removed by centrifugality, or it is fixed in the charge of a column support material so that a mismatch content double strand may not exist in (b) column effluent, or it is fixed on filter supporting and can exist in (c) filtrate so that a mismatch content double strand may not exist.

Although variation is detected from the non-varying sequence of the target polynucleotide sequence in a sample, this invention, [ useful ] Also about a kit suitable for receiving one or more containers into it, this kit, (a) The 1st container containing fixable mismatch binding protein (MBP), (b) The 2nd container containing the solid support which can fix MBP, The 3rd container or two or more containers containing the reagent which can detect the combination of a mismatch content nucleic acid hybrid to (c) mismatch binding protein the sign of the detection of was made possible are included.

This invention, [ useful again although variation is detected from the non-varying sequence of the target polynucleotide sequence in a sample ] Also about a kit suitable for receiving one or more containers into it, this kit, (a) The 1st container containing the mismatch binding protein fixed on solid support, The 2nd containing the reagent which can detect the combination of a mismatch content nucleic acid hybrid to (b) mismatch binding protein the sign of the detection of was made possible, or two or more containers are included.

In an above-mentioned kit, said MBP is MutS or its functional derivative preferably. Solid support is

preferably chosen from natural cellulose, ornamentation cellulose (most preferably nitrocellulose) or polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, polyacrylamide, and the group that consists of agarose.

The mismatch binding protein in which this invention was fixed on solid support again, It is MutS protein or its functional derivative preferably, and the mismatch binding protein the fixed this mismatch binding protein being combinable with a mismatch content polynucleotide molecule is provided.

The easy explanatory view 1 of a drawing shows the result of direct assay of the mismatch using MutS combined with the nitrocellulose. Biotinylated mismatch content DNA (upper 2 line)

Or DNA (lower 2 line) without a mismatch was added into reaction mixed liquor, increasing quantity.

Drawing 2 shows the result of the competitive assay of a mismatch double strand using the MutS protein combined with the nitrocellulose. The amount object (lower 2 line) of 30 without the amount object (upper 2 line) of mismatch content 30 or mismatch of a non-sign was added on the biotinylated amount object of mismatch content 30, increasing quantity. The column at the right end of a figure expresses the well which does not contain MutS.

Drawing 3 shows the result of combination of mismatch content DNA to Escherichia coli mutS fixed on the nitrocellulose. in the concentration which shows a band (or there is no band) with a bright gay double strand, mismatch content DNA duplex (2157 and Bio-Het+) becomes dark -- \*\*\*\* (or visible band) -- it is shown.

Drawing 4 has one mismatch in the position of 15 or 16, or shows the nucleotide sequence of an synthetic oligonucleotide (the amount object of 30) which has an unpaired base pair of 1-4 between the positions of 15 and 16. A board shows the base of a mismatch or the azygos. The result of the research which detects these mismatches or an unpaired base pair is shown in drawing 5.

Drawing 5 shows the result of combination of the DNA duplex containing the displayed mismatch or unpaired base pair to Escherichia coli mutS fixed on the nitrocellulose.

The desirable explanation this invention person of the embodiment devised the comparatively easy method applicable widely for detecting a little salt group conversion of a DNA sequence, or several sorts of such base conversion. This method is based on formation of a mismatch content heteroduplex in case [ of the chain of variation DNA, and wild strain DNA / "complementary" ] a chain carries out an association.

Existence of a mismatch is detected with a very specific form by combining DNA with fixed mismatch binding protein (MBP) like the MutS protein of Escherichia coli first. Assay is detected by either direct assay or competitive assay also in any of many methods, corresponding to the sign which uses after that existence of DNA combined with MBP. This method is [ in / an unpaired base pair ] completely contrastive with the conventional method using the mismatch cutting nuclease enzyme which can cut DNA in that neighborhood.

The method indicated in this book side can be used without (a) simple nature, (b) accuracy, and (c) radioactivity, (d) Provide the variation / polymorphism (polymorphism) detection system (or method) which has an advantage of detectable [ all a little salt group substitution variation and the addition mutation of the base of 1-4, or deletion variation ] \*\*.

Standard reference uses the general principle of previous recombinant DNA technology and cell biology, indicates a like to the conditions of isolation and the handling of nucleic acid, the denaturation of nucleic acid and annealing, hybridization assay, and these, and contains the following.;

Sambrook, J.et al., and MOLECULAR. CLONING: A LABORATORY. MANUAL, 2nd Edition, and Cold. Spring Harbor Press and Cold. Spring Harbor, NY, and 1989; . Albers, B.et al, and MOLECULAR. BIOLOGY OF THE CELL and 2nd. Ed., Garland Publishing, Inc., New York, NY, 1989;

Watson, J.D., et al., MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE, and Volumes. I and II -- Benjamin/Cummings. Publishing Co., Inc., and Menlo. Park, CA.1987; Darnell and J.E.et. al., MOLECULAR CELL BIOLOGY, Scientific American Books, Inc., New York, NY, 1986; Lewin, B.M., GENES II, and John. Wiley & Sons, New York, NY, 1985, and these reference articles, In the whole, it is included in this book side with the cross reference.

MBP is the protein of about 100 kDa(s).

It identifies, is isolated from bacteria and a more advanced living thing, and combines with DNA containing a mismatch base selectively.

MBP Yeast (Valle G et al. and 1991 Yeast 7:981-988; Miret J.J.et al., 1993, J.Biol.Chem.268:3507-3513) etc. Homo sapiens (Mutat.Res.236:269-275; Hughes Stephenson, C.et al., 1989, J.Biol.Chem.264:21177-21782;Karran, P et al., 1990) M.J. et al., 1992, J.Biol.Chem.267:23876-23882; Reenan, A.G.et al., 1993, Genetics 132:963-973; Reenan and A.G.et. It is discovered in al., 1993, and Genetics 132:975-985. Cloning of a platanna and the mismatch binding protein of a mouse derived is done by rad men (M. Radman).

It combines with the DNA-DNA (or DNA-RNA or RNA-RNA) double strand containing an incorrect pair or an unpaired base, and desirable MBP is characterized by excepting notably single strand polynucleotide or the double strand which matched thoroughly (exclusion).

As a desirable gestalt, the MutS protein of completely nature of Escherichia coli origin is used.

However, it means that the words "mismatch binding protein" or "MBP" used for this book side also include the functional derivative of natural protein thoroughly.

The "fragmentation" which has the capability to combine with the mismatch content nucleic acid heteroduplex which can use a "functional derivative" according to this invention, A "variant", "an analog (analog)", or a "chemical derivative" is meant. The "fragmentation" of MBP means any subsets of a molecule, i.e., shorter peptide. Proteinic "variant" means either the whole protein or its DNA hybrid coupling fragmentation and a substantially similar molecule. Mismatch binding protein, for example, the variant of MutS, may be prepared by the recombinant DNA method which the art concerned may be sufficient as and was learned.

The desirable functional derivative of MutS is the MutS protein (Lu, A.L.et al., above-shown;Haber L.T.et al., above-shown-ang, P.P.et al., above-shown) of Salmonella typhimurium.

Or it is a homolog of Escherichia coli MutS in other kinds like the hexA protein (Priebe S.D.et al., above-shown;Haber et al., above-shown) of Streptococcus pneumoniae.

In addition, like the homolog in which a code is carried out by the sequence of the homologous identified in DNA of Homo sapiens, a mouse, a frog, or a hamster, MutS. . Or the homolog of the possible eukaryote of HexA can also be used. (H.et) [ Shimada, T.et al., and J.Biol.Chem.264:20171(1989); Linton, J.et al., and Molec.Cell.Biol.7:3058-3072(1989); Fujii ] al., J.Biol.Chem.264:10057 (1989).

The chemicals derivative of MBP contains additional chemical MOIETI (moieties: two elements which make a pair) which is not a proteinic standard structure including additional extension of the amino acid as a thing in a fusion protein. The covalent modification of peptide is included within the limits of this invention. Such ornamentation may be introduced into intramolecular by making the organic derivation-ized agent which can react to the residue of the selected side chain or an end react to the target amino acid residue in protein.

In selection of the protein which serves as useful MBP for the method of this invention, assay may be performed by the person skilled in the art using a customary method. Thus, when a sample is evaluated about existence of useful MBP in this invention for example, (The whole is included in this book side by cross reference) Mismatch binding assay which is indicated by JIRIKUNI and others (Jiricny et al.) about MutS can be performed. Preferably, filter binding assay is used. In order to prepare an oligonucleotide heteroduplex, the sign of the about 16 bases is preferably carried out

by an oligonucleotide,  $^{32}\text{P}$  which used the kinase reaction, and gamma- $^{32}\text{P}$ -ATP which used kinase like a T4-polynucleotide kinase. Then, 5'(stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ ) - Annealing of the oligonucleotide by which the sign was carried out is carried out to the complementary oligonucleotide which has a mismatch of a little salt group pair under standard conditions. The heteroduplex of 16 base pairs by which annealing was carried out is tested, and is mixed with an excessive amount of protein saved in Hikami during 30 minutes. This mixture is applied to the nitrocellulose filter by which preliminary humidity is carried out in assay buffer solution after that. It draws in gently for several seconds and the assay buffer solution which cooled said filter coldly fully washes. It is air-dried after that, and said filter is suspended and counted in a scintillation solution. Since protein adheres to a filter, it may conclude in combination with MBP any counts on a filter are presumed to be. When there is no such protein, the oligonucleotide heteroduplex by which the sign was carried out bypasses a filter. Thus, useful MBP can be detected and chosen as the method of this invention by using such easy assay.

MBP is fixed by solid support or the carrier as what is used for this invention. "Solid support" or a "carrier" means any base materials combinable with protein. The ornamentation cellulose thru/or the cellulosic (modified) like natural cellulose and a nitrocellulose as a publicly known base material or a carrier, There is polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, polyacrylamide and agarose, or Sepharose (registered trademark). A magnetic bead is also useful. The support material can have any possible structural shape substantially, as long as fixed MBP can combine with a target-nucleic-acid molecule. Thus, the shape of a base material can contain particles, a bead, a porous body, an impermeable strip, and a membrane in the inner surface of reaction vessels, such as test tubes and a microphone rotator plate. A desirable base material contains a nitrocellulose disc or a strip. The person skilled in the art knows many carriers suitable for combination with MBP.

The everyday experiment could confirm these.

The solid support that MBP is adhered or fixed by the covalent bond or a noncovalent bond is the most preferred. It is preferably based on the adsorption using the way noncovalent bond adhesion providing the stability for which it was suitable, and strong adsorption power. MBP is fixed using a publicly known method with the art concerned suitable for the specific solid support by which the capability of MBP combined with mismatch content DNA is not destroyed.

Then, fixed MBP is easily used for detecting a little salt group substitution besides heterozygosity (polymorphism), that mismatch content DNA is isolated from a mixture, or removing mismatch content DNA from a mixture.

In one embodiment, the surface of the multi well plate of polystyrene or other plastics serves as solid support. In other gestalten, the bottom of the well of a multi well plate adheres to the solid support which MBP combines.

In a desirable embodiment, immobilization and DNA binding are performed in 96 well blotting device, and the sheet of subsequent nitrocellulose (or other base materials) paper can be demounted in order to evaluate a reaction. For example, the color development on a nitrocellulose may be used for evaluating the combination on the basis of the chromogen of the enzyme as some detection thread, and the enzyme which serves as precursors of a coloring reaction, or the substrate of chemicals coloring.

Processing for preventing the further combination of protein or nucleic acid using a publicly known method or reagent in the art concerned following adhesion of MBP in a base material ("block")

\*\* — \*\*.

Fixed MBP is contacted with a small oligonucleotide heteroduplex molecule, and is combined (until it is saturated). Oligonucleotides are about 30 base pairs preferably. The DNA duplex containing the



mismatch recognized by MBP good (that is, it joins together) is used for a test. the detection system for which they were suitable since such an oligonucleotide was prepared using the nucleotide which had the five prime end embellished with the sign which contains a mismatch or, with which the lacking oligonucleotide can carry out preparation detection of this -- it may be preferably detected by spectrophotometry or a chemiluminescence method. In a desirable gestalt, biotin ornamentation is carried out and an oligonucleotide can be detected using the detection system on the basis of the avidin or streptoavidin combined by biotin and high affinity. Streptoavidin is combinable with an enzyme, and existence of this enzyme is detected using a chromogen substrate, and is measured by the color development.

In the method of this invention, the example of a useful enzyme Peroxidase of a horseradish, The alkaline phosphatase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, A malic dehydrogenase, staphylococcus nuclease, delta V-steroid isomerase, Yeast alcohol dehydrogenase, alpha-glycerophosphate dehydrogenase, They are triosephosphate isomerase, asparaginase, glucose oxidase, beta-galacto SHIDAZE, RNase, an urease, catalase, glucoamylase, and acetylcholineesterase.

The sign which can be detected may also be the radioisotope which a gammacounter or a scintillation counter uses it, or may be detected by autoradiography.

A fluorescent compound may be sufficient as a detectable sign. When put to the light of the wavelength for which the molecule labeled fluorescently was suitable, the existence may be detected by the fluorescence using a subsequent microscope or fluorometry. As a fluorescent-labeling compound most generally used, they are fluorescein isothiocyanic acid, a rhodamine, a phycoerythrin, a phycocyanin, allophycocyanin,  $\alpha$ -lid RUDEHIDO, and fluorescamine.

$^{152}\text{Eu}$  or a fluorescence radioactive metal like other lanthanoid series sequences may be sufficient as a detectable sign. These metal can be made to adhere to an oligonucleotide using a metal chelate group like a diethylenetriamine pentaacetic acid or ethylenediaminetetraacetic acid.

A detectable sign may be a chemiluminescence compound. The existence of a molecule by which the sign was carried out by chemiluminescence is determined by detecting the existence of luminescence which takes place in process of a next chemical reaction. As an example of an especially useful chemiluminescence labeled compound, they are luminol, isoluminol, Saroma tic acridinium ester, imidazole, an acridinium salt, and oxalic acid ester.

Similarly, a bioluminescence compound may be used for the sign of an oligonucleotide. Living thing coloring is a thing of the mold of the chemiluminescence found out in a biological system to which catalyst protein makes the effect of a chemiluminescence reaction increase. Existence of bioluminescence protein is determined by detection of the existence of luminescence.

Bioluminescence compounds important for the purpose of carrying out a sign are luciferin, luciferase, and aequorin.

DNA-DNA, DNA-RNA, or MBP combined with the RNA-RNA hybrid may be detected by either of the direct or indirect targets. In direct detection, the sign of the detection of Polly or an oligonucleotide double strand is made possible using a sign about which it argues in respect of this book.

In indirect detection, assay uses the competition of combination to MBP of test DNA of the mismatch content double strand which already joined together or is put simultaneously. Thus, \*\*\*\* combination of the mismatch content oligonucleotide by which the sign was carried out is carried out at MBP, or it incubates with MBP and test DNA. If there is a DNA which contains more mismatches in a test sample, the combination of the oligonucleotide to MBP by which the sign was carried out will be generated less.

The test sample which should be assayed can be put into any culture media of concern, and, probably, is generally a sample with medical, veterinary medicine nutritional, or industrial

importance. Especially the sample and body fluid of Homo sapiens and an animal containing the cell in which nucleic acid may be prepared may be assayed by this method. As desirable source, there are blood, a blood serum, other organizations, milk, urine, cerebrospinal fluid, saliva, a feces thing, a lung suction thing, a throat wiping thing, a wiping thing of a reproductive organ and an invasion thing, a rectum wiping thing, and a nasopharynx suction thing.

In order to detect heterozygote, the heterozygote of DNA of the detection diploid living thing origin of polymorphism, or polymorphism, test DNA is prepared by denaturalizing and carrying out annealing of the DNA amplified by PCR of diploid living thing origin preferably. Annealing of said test DNA is prepared and carried out by the primer by which the sign was carried out, and it is added by the well or other reaction vessels containing fixed MBP which has already been combined with the oligonucleotide of a mismatch. Instead, test DNA can be mixed to the oligonucleotide of a mismatch and it can add in the well or other containers containing MBP which had this mixture fixed.

Reading of spectral luminous intensity is performed on wavelength suitable for fixed-quantity detection of test DNA. (1) Combination of test DNA to fixed MBP, or the replacement of the oligonucleotide of the mismatch from MBP by which (2) immobilization was carried out. After performing time and an incubation suitable for performing whether it is **\*\*\*\*\***, said DNA solution is removed, a well is washed and reading of spectral luminous intensity is performed in wavelength suitable for fixed-quantity detection of the united mismatch oligonucleotide.

Probably, in wide range DNA concentration, the rates of reading of test DNA to reading of a mismatch oligonucleotide differ greatly by mismatch content test DNA and test DNA without a mismatch. A standard curve is created using a publicly known quantity of DNA which permits the special feature of test DNA as a homozygote or heterozygote so that it is not necessary to quantify test DNA before assay. Thus, the single stranded DNA sample can test at least about 80 sorts of DNA samples by 96 well microplate enough to determine heterozygote and single.

In order to detect the detection homozygote variation of a homozygote, publicly known homozygote wild strain DNA must be combined with a test DNA sample before denaturation and annealing. Only test DNA (homozygote) including variation will form mismatch content DNA which can rival a mismatch oligonucleotide about the combination to fixed MBP.

The method of this invention may be used only with both test DNAs by which the mismatch oligonucleotide by which (a) sign was carried out, or (b) sign was carried out. However, as for both these methods, nucleic acid concentration is determined.

It needs to have to do a test in the test DNA concentration from which many differ.

When the sign of the mismatch oligonucleotide is carried out, a test, It is based on comparison with the curve of this result, and a standard curve about competition with the concentration which differs in many test DNAs (several), and the standard of a mismatch and a non-mismatch (concentration expressed as the number of mols of a double strand molecule).

when the sign of the test DNA is carried out, a test is related with resembling comparison with the curve of a result, and a standard curve, setting about the standard of saturation, and a mismatch and a non-mismatch, and measuring the range of the combination to MBP of a lot of concentration.

The art in which it is generally used in the molecular biology of the refining modernization of the amplified DNA sample and in which it is used most innovatively and extensively is the method of a polymerase chain reaction (PCR) of making a DNA sequence amplifying from such a very small quantity amount of starts that it being hardly undetectable. As literature of PCR, Mullis, KB., 1986, and Cold. Spring Harbor Symp.Quant.Biol.51:263-273;Saiki, R.Ket al., 1985, and Bio/Technology 3:1008-1012; And Mullis and KB.et. Refer to al., 1987, and Meth.Enzymol.155:335-350. In addition, since PCR can make a specific sequence amplify, it is one step fundamentally and can perform

refining of a specific sequence from genomic DNA. PCR is an essential component of all research on the fact of a human genome.

It is identification of a gene, and a central component of cloning, and it is increasingly used for diagnosis of a hereditary disease and an infection disease, and is widely used also in the trial.

However, in various application especially gene cloning, and variation detection, PCR has the peculiar tendency of polymerase to generate the error by insertion of the un-complementary base which was wrong during composition. Although the fidelity of almost all replication polymerases in the living body is a grade which inserts only one mistaken base for every  $10^{10}$  duplicate bases, the polymerase used for PCR may be an error ratio of one mistaken base per about  $10^4$  duplicate bases. The fraction as used in the charge of a start material and a sequence with an amplified molecule important for this high error ratio means what will not be the same.

This method is useful although the amplified DNA sample is refined using MBP fixed [ for removing the amount (minority) sequence of small number introduced by the amplification process, and a molecule including a sequence shift ].

For example, if a DNA fragment is amplified with 20 duplicates (general quantity of amplification), the significant fraction of a final molecule contains one or the mistaken base beyond it. This makes the danger of carrying out cloning of the different nucleotide sequence from a start sequence increase greatly in a cloning experiment.

In the variation detection assay about the denaturation (single-strand-izing) and annealing of a sample which were amplified by PCR, it may be evaluated like whether the mistaken base inserted by PCR is the variation in the sample of a basis. Thus, it is necessary to evaluate all the DNA molecules with the sequence shift introduced by the duplicate errors of PCR for exact variation detection. The method indicated in this book side attains this refining with an easy and linear form. Fixed MBP may be used for refining the amplified DNA sample. MBP is fixed a solid phase base material and by combining with a nitrocellulose filter, a sepharose bead, or a magnetic bead preferably. If required, said filter or a bead will be processed so that combination of double stranded DNA may be prevented.

The amplified DNA sample denaturalizes by heat treatment, and re-annealing is carried out. By the random nature of the error of PCR, all the mistaken bases will be discovered as a matter of fact in the mismatch base pair after annealing.

Fixed MBP is added to a sample and a solution is mixed by shaking calmly. Mismatch content DNA which fixed MBP and either combined (any) is removed by the character of the used solid support settling a bead besides a solution, or by removing a bead magnetically, for example by removing a filter. This leaves the DNA duplex which matched correctly.

In addition to refining the DNA sample amplified by removing a molecule including the error introduced during amplification, refining using fixed MBP, It is used for enriching many sequences of quantity (majority) when examining the branched (diverged) DNA sequence which exists repeatedly like the sequence of an immunoglobulin.

(at point of a sequence) Probably, it will also be required more refining which is indicated in this book side than 1 time (round), and to perform amplification [ as much as possible ] larger than 1 time, in order to remove a a small number of kind from the sample amplified from DNA of the mixed group (population) thoroughly.

The half of the parent sequence in a heterozygote sample, Annealing should be carried out to the complementary chain of the same parent sequence origin thing, and a molecule without a mismatch is formed, so please note being able to use this method, although a sequence is refined from the sequence by which both a homozygote and heterozygote were amplified. When it puts in another

way and the charge of a start material is heterozygote, since the half of the molecule by which annealing was carried out contains a mismatch because of the difference in a start sequence, it is removed from a sample. However, since the half of the molecule by which annealing was carried out does not contain such a mismatch, they are removed from a sample, only when the mismatch manufactured as a result of the error between amplification is included. Anyway, probably, variation detection assay needs the 2nd denaturation and annealing.

In the pursuit purpose into which the polymorphism map of a human genome is developed, it is increasingly more important that the specific allele of a given gene can be identified as the allele of many pathogenic genes is identified from the allele identification in a double (multi) allele system. Fixed MBP provides the easy method of allele identification.

Thoroughly [ one allele ], as for this probe, the oligonucleotide probe characteristic for each allele of a given gene by which the sign was carried out is prepared so that complementarily. That is, this probe is prepared so that one or the mismatch beyond it may be formed, when it becomes the mistaken allele and pair. Said probe will be mixed with an excessive amount of amplified test DNAs, and each duplicate of this probe will be found out in the double strand after denaturation and annealing. This process is repeated using the probe about each allele in question. [ whether the DNA mixture by which annealing was carried out is mixed with MBP fixed on the base material which may be removed from suspension by (1) centrifugality after that, and ] (2) It is performed whether they are whether it lets the filter supporting containing MBP by which it let the micro column of MBP fixed on the suitable column base material pass, or (3) immobilization was carried out pass, and \*\*\*\*\*. MBP which was fixed in the case of which must be the excessive amount that all the mismatch content DNAs are held. Supernatant liquid, column outflow (flowing through) liquid, or filtrate is analyzed about existence of a sign. In test DNA, the sign will be detected for the probe, only when completely complementary to allele.

In order to confirm that the sequence of the probe of a single strand does not exist, it is required on a base material to include several sorts of single stranded DNA uniting elements instead of fixed MBP, and it obtains, or may be required at least. This system functions by good [ same ] on a homozygote or heterozygote conditions.

Kit this invention relates to a kit useful although the method indicated in this book side is enforced again, or a reagent (or unit) system. Such a kit includes the combination of the reagent containing the essential element required of performing assay according to the method indicated in this book side. Said reagent system as the constituent which the conformity of the reagent probably permits in the shape of test equipment, or admixture, Or it is provided with the gestalt containing explanatories usually indicated for implementation of assay, such as one or more containers, a device, etc. which hold a test kit, i.e., a required reagent, more typically, commercially packed as a packed combination. The kit of this invention may also contain any gestalten and constituents for carrying out the gestalt of the various assays indicated in this book side.

In the case of which, a reagent system contains MBP fixed by the ability to carry out (1) immobilization or its functional derivative, and an additional reagent useful when performing (2) assays with MutS preferably. Said kit may be arbitrary and may also contain the mismatch content oligonucleotide by which the sign was carried out. In order to detect a specific variation, the kit can also contain the primer to which the sign of [ for performing PCR ] was carried out. The kit according to this invention can contain additionally auxiliary chemicals like the component of the solution in which combination of the double strand to MBP fixed there is performed.

This invention will be more easily understood by referring to the example of the following provided in an example for this invention indicated broadly. However, unless it is written clearly below, it does not mean that the following examples limit this invention.

It is reaction buffer solution (20mM.) about the joint A. material of mismatch content DNA by the

mismatch binding protein fixed example 1, and a method nitrocellulose sheet (0.45 micrometer, Schleicher & Schull). Preparation of MBP of which 1. immobilization was done Humidity was carried out by Tris pH7.6-0.01mM EDTA, 5mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.1mM DTT, and it has arranged to the dot blot device (Bio-Rad).

MBP and Escherichia coli MutS in which the concentration of 0.5microg/10microl reaction buffer solution was refined were spotted in the nitrocellulose paper of each well. This well was incubated at the room temperature and residual liquid was attracted under vacuum (suction machine). After adding a solution to a well, by throwing it away, the reaction buffer solution of 100microl washed each well twice. Residual liquid was attracted under vacuum after the 2nd washing.

2. blocking others -- in order to prevent combination of protein or nucleic acid, the nitrocellulose filter was blocked by bovine serum albumin (BSA). The reaction buffer solution (200microl) which contains BSA 1% (w/v) was added to each well. The reaction buffer solution of 100microl washed each well twice by throwing away a solution, after placing at a room temperature for 1 hour, and throwing it away, after adding a solution to a well. Residual liquid was attracted under vacuum after the 2nd washing.

3. Oligonucleotide The sequence of the oligonucleotide used by research of these was obtained from the field of 30 bases surrounding the part of the sickle cell variation of the Homo sapiens beta globin (beta-globin) gene. the variation sequence used for forming a mismatch -- sickle cell variation -- it is not (a actual sickle cell variation is A:T->T:A conversion) -- a mismatch is in the part of sickle cell variation. The biotinylated oligonucleotide was biotinylated in the five prime end of a variation chain. It biotinylated by composition by adding the nucleotide by which biotin ornamentation was carried out to the five prime end of an oligonucleotide.

G: T mismatch

ミュータント GCACCTGACT CCTGGGGAGA AGTCTGCCGT [SEQ ID NO:1]

野生種 CGTGGACTGA GGACTCCTCT TCAGACGGCA [SEQ ID NO:2]

With no mismatch

ミュータント GCACCTGACT CCTGGGGAGA AGTCTGCCGT [SEQ ID NO:1]

ミュータント CGTGGACTGA GGACCCCTCT TCAGACGGCA [SEQ ID NO:3]

4. Combination with DNA The biotinylation oligonucleotide in the reaction buffer solution of 20microl which contains BSA 1% was added to each well. Residual liquid was thrown away after placing for 30 minutes at a room temperature. After adding a solution to a well, by throwing it away, the reaction buffer solution of 100microl washed each well 5 times. Residual liquid was attracted under vacuum after the 5th washing.

5. Combination with SUTOREPUTABIJIN junction horseradish peroxidase (HRP) Combination of SUTOREPUTABIJIN detected existence of biotin. The amount of 100microl of SUTOREPUTABIJIN junction HRP (Pierce Chemicals) in the concentration of 50mg/ml of the reaction buffer solution which contains BSA 1% was added to each well. The reaction buffer solution of 100microl washed each well 5 times by throwing away a solution, after placing at a room temperature for 2 hours, and throwing it away, after adding a solution to a well. Residual liquid was attracted under vacuum after the 5th washing.

6. Development of pointing study coloring (ECL) [Enhanced ChemiLuminescence registered trademark] The nitrocellulose sheet was removed from the dot blot device, and 10-ml reaction buffer solution washed 3 times in the Petri dish. The nitrocellulose was filled with a 5-ml ECL

developing solution (Amersham). The substrate of HRP in this reagent is a chemiluminescence compound. The solution was removed after placing for 1 minute. Drive rotting of the nitrocellulose was carried out and it placed between two transparent plastic sheets. The nitrocellulose sheet protected in this way was exposed to the X-ray film in the dark place by various irradiation time. In the experiment reported to this book side, exposure time is 1 minute.

7. Competition In competition research, DNA binding is as being indicated by \*\*\*\* except having mixed \*\* without mismatch content or a mismatch with a constant rate of biotinylated mismatch content oligonucleotides (5ng), and non-sign DNA of various quantity, and having added to the well. B. Result Specific joint drawing 1 of mismatch content DNA by MBP of which 1. immobilization was done shows the result (duplication experiment) of having added the increase of stock of DNA (lower 2 line) without biotinylated mismatch content DNA (upper 2 line) or the mismatch.

MBP by which the amount object of 30 without a detectable mismatch was fixed in spite of not having observed even DNA of 200ng was able to detect a small quantity of about 0.2 ng of the amount object of mismatch content 30 (the line around a lower spot is based on imperfect washing).

2. Competitive assay drawing 2 shows the result (duplication experiment) of addition of the increase of stock of the amount object (lower 2 line) of 30 without the amount object (upper 2 line) of mismatch content 30 or mismatch of a non-sign to the amount object of mismatch content 30 in which 5ng was biotinylated. Although competition was clearly seen in mismatch content DNA of 50ng, in the whole, DNA without a mismatch did not compete to 500ng. The fairly bright column on a figure does not contain MBP.

It was shown from this result that fixed MBP in the amount object of 30 used in the above-mentioned experiment at least identifies at least between mismatch content DNA and DNAs which are completely pairs by the effect of the size of 3 order (orders). The same result is obtained even if it uses the amount object of 54 by the sequence of V3 loop origin of HIV. therefore, when it is alike, it takes and discriminating power decreases, and the amount object of 300 considered to be the greatest useful length for research of the polymorphism of a human genome is used, the discernment effect will show up [ at which the quantity of the double strand which became a pair thoroughly increases ] in the arrangement of the order of 100.

It used for detecting heterozygote [ in / for the method indicated by the detection above of the heterozygote in example II human genome DNA / the specific position of human genome DNA ]. (Glutamine is encoded) PCR amplification was performed about the portion of the exon 3 of the Homo sapiens glucokinase gene extended from the codon 98 to a stop codon (Soffel et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:7698-7702 (1992)). The wild type double strand sequence (SEQ ID NO:4 and SEQ ID NO:5) of 100 bases equivalent to exon 3 Homo sapiens glucokinase is the following arrangement.

```
5'   gcactaacttcagggtgatgctggtgaagggtgggagaagg
3'   cgtgattgaagtcccactacgaccacttccacctcttcc
```

```
tgaggagggggcagtgaggcgtgaagaccaaaccagatg
actcctccccgcacctcgcaacttctggttctgtggtctac
```

```
tactccatccccgaggacgcc 3' (SEQ ID NO:4)
```

```
atgaggtaggggctcctgcgg 5' (SEQ ID NO:5)
```

In heterozygote DNA (shown below), C of the CAG codon of an underline was varied to T. (1) in this position — publicly known heterozygote and (2) — a homozygote publicly known in this position, and (3) — PCR amplification of the tested DNA sequence was carried out from the homozygote so presumed in this position, and \*\*\*\*\* genomic DNA.

It denaturalized by heat treatment, re-annealing of the test DNA was carried out, and those

combination was tested in the mismatch binding protein assay fixed according to this invention using MutS of Escherichia coli.

A. material and method: -- 1. PCR amplification -- : using the following template (mold) -- 2157-heterozygote (b) DGK-101-human genome DNA (homozygote in the glucokinase gene exon 3) in (a) glucokinase gene exon 3

(c) (marketed from Sigma Chemical Co.) Human genome DNA, the male which are called sigma DNA (the glucokinase gene exon 3 is presumed) (it obtained from Operon) A primer is refined by HPLC, Two DNA strands It reaches SEQ ID NO:4. SEQ ID NO: It is the correspond following sequence at the five prime end of five.

プライマー # 1 : 5' (biotin)-GCACTAACTTCAGGGTGATG

プライマー # 2 : 5' -GCGTCCTCGGGGATGGAGTA

The biotin combined with the five prime end so that it might be detected in the below-mentioned ECL detection system was included in PCR primer#1. After removing the primer which is not used, in order to perform a fixed quantity of various amplification products, radiolabeling of primer #2 was carried out with 5-<sup>32</sup>P-phosphoric acid. Before using primer #2 in amplification, the kinase reaction was used and the sign was carried out by <sup>32</sup>P. Kinase reaction mixtures are 70 mM Tris-HCl and pH 7.6.; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 5mM DTT; 20microcurie <sup>32</sup>P-ATP; 30 unit T4 polynucleotide kinase; And 500ngDNA (primer #2) is contained. The reacting weight of 20microl performed the kinase reaction for 30 minutes at 37 \*\*. Kinase was inactivated by heat-treating for 10 minutes at 70 \*\*. DNA was saved at -20 \*\*.

An PCR reaction, 10mM Tris-HCl pH8.3; . 50mM KCl; 15mM MgCl<sub>2</sub>; 0.001% gelatin (W/V); 0.05mM. dATP; 0.05mM dTTP; 0.05mM. dGTP; 0.05mM dCTP; 0.1microM primer # -- 1; 0.075microM primer #2; 0.025microM <sup>32</sup>P primer #2;200ng template DNA; -- and -- 2.5 unit AmpliTaq. DNA polymerase (Perkin-Elmer) is contained. Reacting weight is 100microl. The parkin Elmer thermocycler (Perkin-Elmer thermocycler) performed 30 cycles and amplification by placing for 1 minute, making it denaturalize at 90 \*\*, placing for 1 minute, carrying out annealing at 55 \*\*, placing for 2 minutes and making it elongate at 72 \*\*. According to a manufacturer's protocol, the centrifugal dialysis using 30 micro of Centricon concentrator (Amicon) removed the primer which was not used. Under [ a fixed quantity / product / PCR / by adding equivalent weight (it measured as cpm of radioactivity) on 8% of nondenaturing polyacrylamide gel, dyeing by an ethidium bromide, and comparing with standard DNA ].

2: Assay of the fixed mismatch binding protein: The following schedules are followed (in a parkin Elmer thermocycler).

: which performed denaturation and annealing of DNA -- 100 \*\* -- for 4 minutes; 50 \*\* -- 1 hour; 75 \*\* -- for 4 minutes; 50 \*\* -- for 30 minutes; Next, it cooled to the room temperature.

A nitrocellulose sheet (0.45mM, Schleicher and Schuell, BA85), Humidity is carried out by floating on reaction buffer solution (20 mM Tris-HCl, pH7.6; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 0.1mM DTT; 0.01mM EDTA), It has arranged on the blotting paper (Schleicher and Schuell GB002) of three sheets of a slot blot device (Hoefer Scientific Instruments). The reaction buffer solution of 100microl was added to each well. After putting on a room temperature for 5 minutes, remains buffer solution was attracted in the vacuum. MutS (they are 500ng to 20microl reaction buffer solution)

it added to each well. Tales doses of reaction buffer solution was added to the well "without MutS." Before progressing to the following step, said device was neglected to the room temperature for 20 minutes.

The nitrocellulose was blocked by adding BSA without HRP of 200microl to each well. After allowing to stand at a room temperature for 1 hour, the remains solution was attracted under vacuum.

The DNA sample was added to the 20microl reaction buffer solution which contains HRP free BSA 3%.

After allowing to stand for 30 minutes at a room temperature, and adding a solution to a well, the reaction buffer solution of 100microl washed the well 5 times by carrying out the decantation of it.

By visualizing combination of streptoavidin to biotin, the existence of DNA united on the nitrocellulose sheet by which the biotin sign was carried out was detected. 100microl streptoavidin HRP in the reaction buffer solution containing BSA without 3% of HRP was added to each well.

After allowing to stand for 20 minutes at a room temperature, the decantation of the remains solution was carried out. After adding a solution to each well, by carrying out the decantation of it, the reaction buffer solution of 100microl washed the well 5 times. The solution which remained was removed under vacuum after the 5th washing.

3. Pointing study coloring (ECL) development The nitrocellulose sheet was removed from said device and 50-ml reaction buffer solution washed every [ a for / 1 minute ] 4 times in the small tray. Drive rotting of the nitrocellulose sheet was carried out, and it was immersed in a 10-ml ECL developing solution (Amerson). 1 minute afterward, drive rotting of the nitrocellulose sheet was removed and carried out, and it placed between two transparent plastic sheets. The nitrocellulose sheet protected in this way was put to the X-ray film for 30 minutes in the dark place.

B. Result A result is shown in drawing 3. Bio-Het means the amount object double strand of synthetic 30 of SEQID NO:1 and SEQ ID NO:3. This double strand contains a G:T mismatch in the position of 15. SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO which do not have a mismatch in the position of 15 with Bio-Homo: Mean the amount object double strand of synthetic 30 of two. Even as for DNA of 10ng, combination of Bio-Homo was not detected to Bio-Het being detected in a small quantity of about 0.1 ng. That combination is not observed in lack ("no MutS" column) of MutS shows that all the observed DNA binding is MutS dependence.

Combination of the heterozygote nucleic acid (2157) to MutS was clearly seen in 0.6ng. (It is not dependent on the sauce of DNA) Combination of a homozygote is 1.

In 25ng, it could detect faintly and was clearly detected in 2.5ng. Thus, heterozygote DNA was detected by the at least two to 4 time fitness of homozygote DNA in this assay. It was thought more that combination of high-concentration homozygote DNA was a result of the error introduced between amplification by Taq polymerase. Such a high error ratio in incorporation of the nucleotide by this polymerase is the phenomenon known well. Thus, in addition, such an unsuitable combination expresses the mismatch combination by fixed MutS.



**\* NOTICES \***

**JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

**[Claim(s)]**

1. It is a method for detecting variation from a non-varying sequence of target polynucleotide of a sample, (a) In the bottom of a condition which a mismatch content polynucleotide molecule combines with mismatch binding protein fixed by solid support, Polynucleotide or an oligonucleotide the sign of the detection of said sample origin of was made possible, Said both fixed mismatch binding protein is incubated, It reaches. (b) Combination of one mismatch content polynucleotide of said sample origins to said mismatch binding protein is detected, A method that an existence of polynucleotide or an oligonucleotide combined with an implication and said mismatch binding protein, and the sign of the detection of was made possible is characterized by showing variation in a sequence of said target polynucleotide.

2. Method according to claim 1 that said mismatch binding protein is characterized by being functional derivative of MutS protein or MutS protein.

3. Method according to claim 1, wherein said solid support is chosen from natural cellulose, ornamentation cellulose, polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, polyacrylamide, and group that consists of agarose.

4. Method according to claim 3, wherein said solid support is nitrocellulose membrane.

5. Method according to claim 1 that polynucleotide or oligonucleotide sign of said detection of was made possible is characterized by carrying out sign with chromogen compound, chemiluminescence compound, bioluminescence compound, fluorescent compound, or radiolabeling.

6. Method according to claim 1, wherein sign of polynucleotide or oligonucleotide sign of said detection of was made possible is carried out with biotin.

7. Method according to claim 1, wherein said target polynucleotide is DNA.

8. It is a method for detecting variation from a non-varying sequence of double strand target mammals polynucleotide in a sample, (a) Double strand polynucleotide of either of said samples is denatured, consider it as a single strand, carry out re-annealing of this single strand, and consider it as a double strand, (b) Under existence of a mismatch content oligonucleotide combinable with (i) mismatch binding protein the sign of the detection of was made possible, or -- Preliminary incubation is carried out with a mismatch content oligonucleotide the sign of the detection of was made possible, and (ii) mismatch binding protein, In either under conditions of being combined with this mismatch content oligonucleotide, Said double strand of a step (a) by which re-annealing was denaturalized and carried out, and said mismatch binding protein fixed on solid support, \*\*\*\*\* -- incubating -- and -- (c) -- detecting quantity of a mismatch content oligonucleotide the sign of the detection of was made possible combined with said mismatch binding protein. . An implication and existence of variation in said double strand mammals polynucleotide of said sample receive mismatch binding protein. Reduction of combination of an oligonucleotide (mismatch content) the

sign of said detection of was made possible is produced. A method by which it is characterized.

9. Method according to claim 8, wherein said solid support is chosen from natural cellulose, ornamentation cellulose, polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, polyacrylamide, and group that consists of agarose.

10. A method according to claim 9, wherein said solid support is a nitrocellulose membrane.

A method for removing a sequence including a sequence of the amount of small number or a sequence error introduced between amplification processes from a DNA sample characterized by comprising the following of which 11. amplification was done.

(a) Manufacture a mixture which puts said amplified DNA sample on a denaturation state, ranks second, performs re-annealing so that a sequence or an error content sequence of the amount of small number may form mismatch content DNA duplex, and contains a double strand of a mismatch.

(b) It is said mixture of a step (a) so that a double strand of a mismatch may combine with fixed mismatch binding protein.

Said fixed mismatch binding protein.

both incubating -- and -- . (c) -- removing said fixed mismatch binding protein which mismatch content DNA combined from said amplified DNA sample, It contains. A sequence error

12. In a multiple-alleles system of a sample of amplified DNA, it is a method for identifying specific allele, in the bottom of (a) denaturation condition, Mix an oligonucleotide probe the sign of the completely complementary detection of was made possible to a DNA sequence of said specific allele, and an excessive amount of amplified test DNAs, and it ranks second, Annealing is carried out so that each duplicate of denaturation and an account probe of back to front which carried out annealing may be found out in double stranded DNA, (b) So that all mismatch content DNA may be held on fixed mismatch binding protein, Said mixture formed at a step (a), and said an excessive amount of fixed mismatch binding protein, \*\*\*\*\* -- incubating, (c) -- removing said fixed mismatch binding protein combined with one of mismatch (any) content DNAs from said amplified test DNA. It reaches. (d) an implication and an existence of DNA in said sample by which the sign was carried out detecting an existence of a probe the sign of said detection of was made possible in a sample from which said fixed mismatch binding protein was removed, Said probe shows a completely complementary thing to allele in said test DNA. A method by which it is characterized. A kit which suited although [ receiving one or more containers in inside ] variation is detected from a non-varying sequence of a target polynucleotide sequence characterized by comprising the following in 13. sample and it is useful.

(a) The 1st container containing fixable mismatch binding protein.

(b) The 2nd container containing solid support which can fix said mismatch binding protein, (c) The 3rd containing a reagent which can detect combination of a mismatch content nucleic acid double strand to said mismatch binding protein the sign of the detection of was made possible, or two or more containers

A kit which suited although [ receiving one or more containers in inside ] variation is detected from a non-varying sequence of a target polynucleotide sequence characterized by comprising the following in 14. sample and it is useful.

(a) The 1st container containing mismatch binding protein fixed on solid support.

(b) The 2nd containing a reagent which can detect combination of a mismatch content nucleic acid double strand to said mismatch binding protein the sign of the detection of was made possible, or two or more containers.

15. The kit according to claim 13, wherein said mismatch binding protein is a functional derivative of MutS or Muts.
  16. The kit according to claim 14, wherein said mismatch binding protein is a functional derivative of MutS or Muts.
  17. The kit according to claim 13, wherein said solid support is chosen from natural cellulose, ornamentation cellulose, polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, polyacrylamide, and a group that consists of agarose.
  18. The kit according to claim 17, wherein said solid support is a nitrocellulose membrane.
  19. The kit according to claim 14, wherein said solid support is chosen from natural cellulose, ornamentation cellulose, polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, polyacrylamide, and a group that consists of agarose.
  20. The kit according to claim 19, wherein said solid support is a nitrocellulose membrane.
  21. Mismatch binding protein fixed on solid support, wherein fixed mismatch binding protein is able to combine with a mismatch content polynucleotide molecule.
  22. The fixed mismatch binding protein according to claim 21 being a functional derivative of MutS protein or MutS protein.
- 

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

---

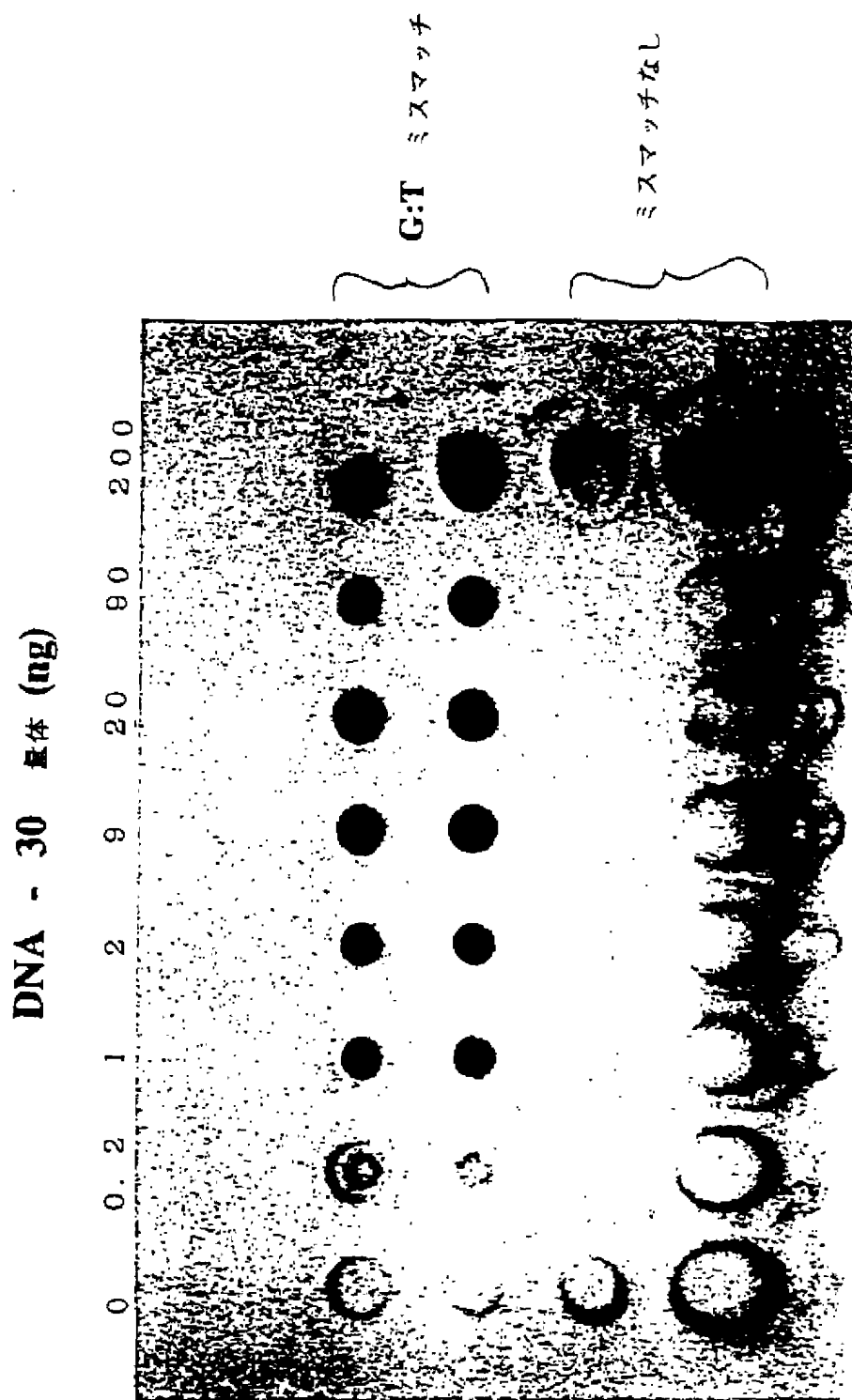
**DRAWINGS**

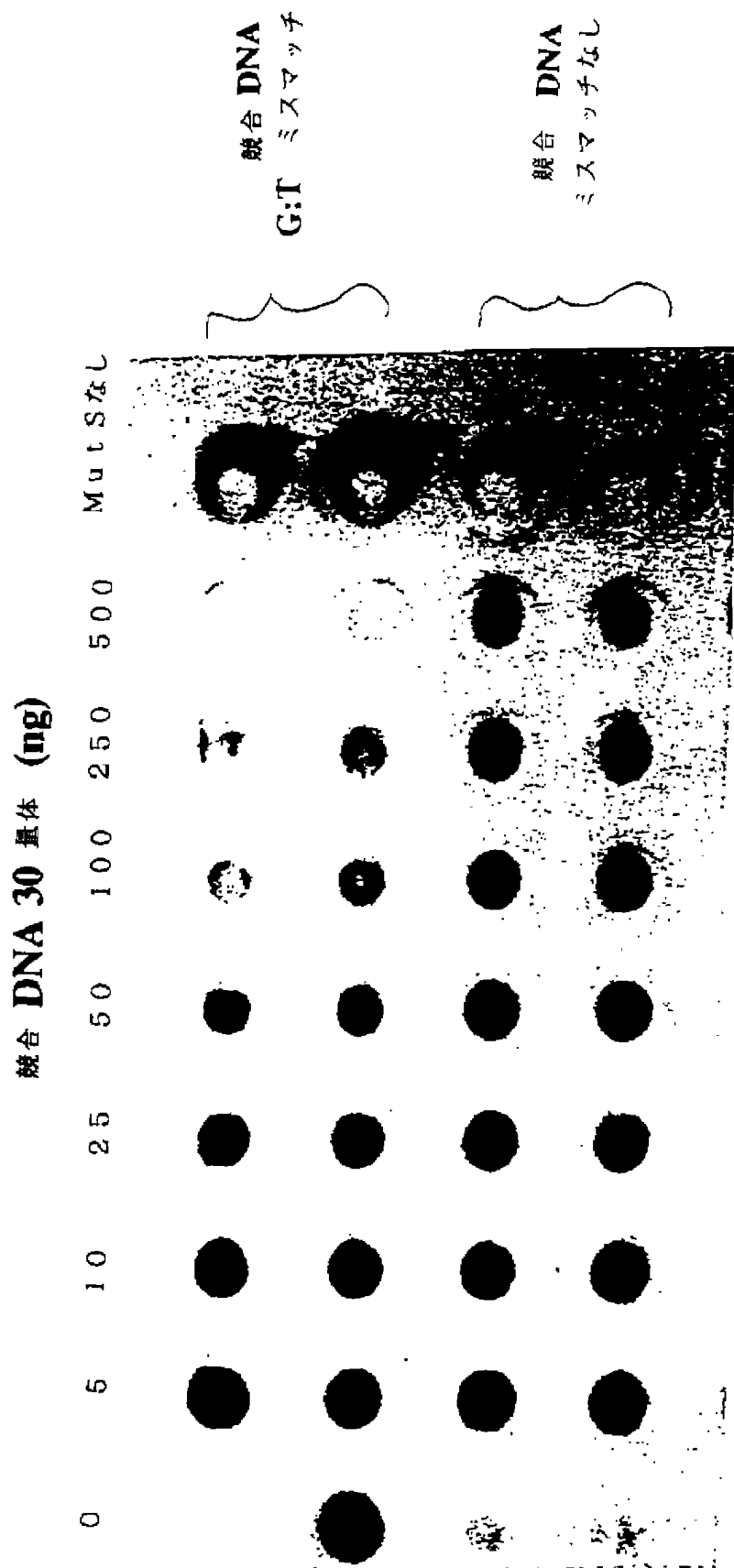
---

[Drawing 1]

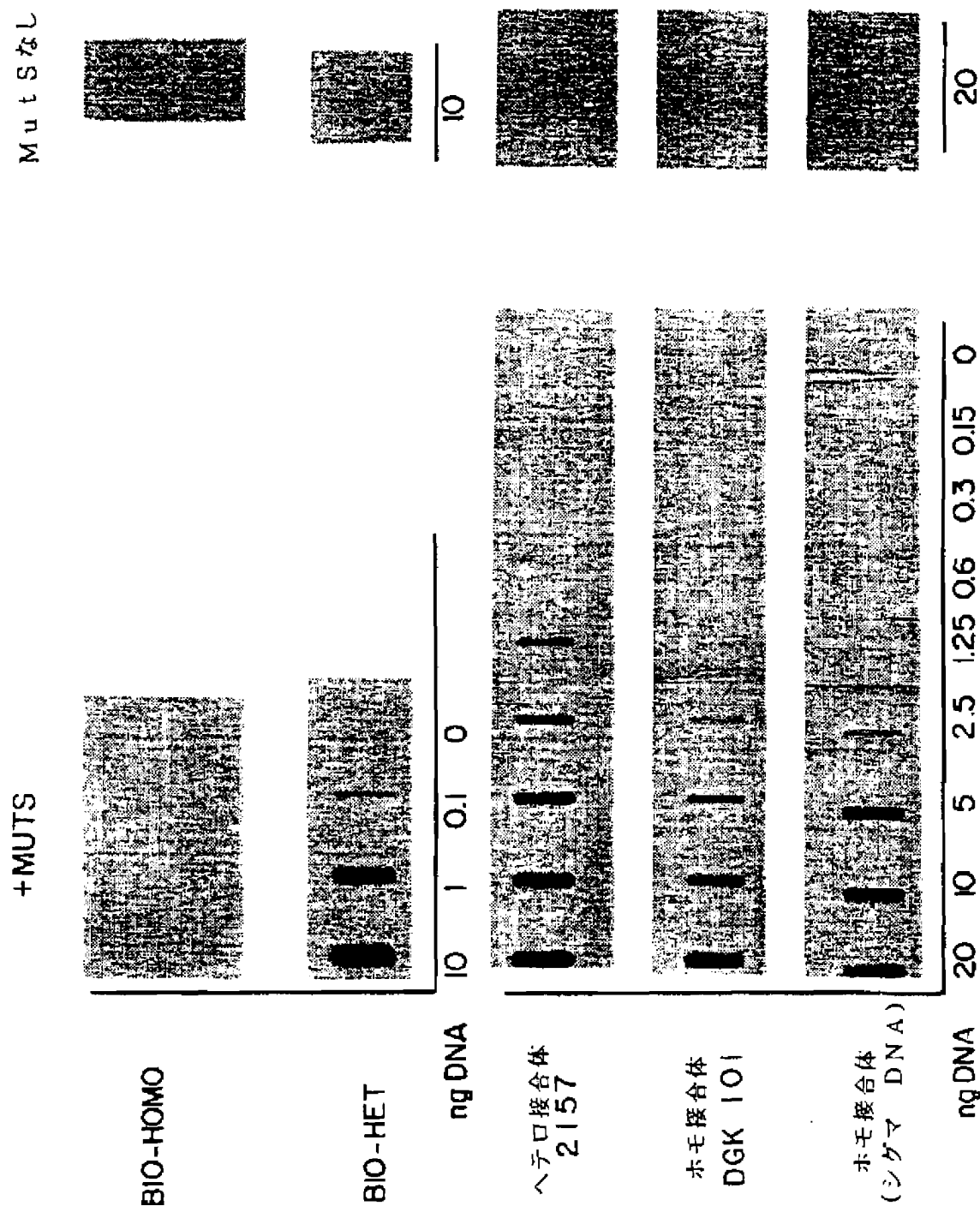
## FIGURE 1

[Drawing 2]



**FIGURE 2**

[Drawing 3]



**FIG. 3**

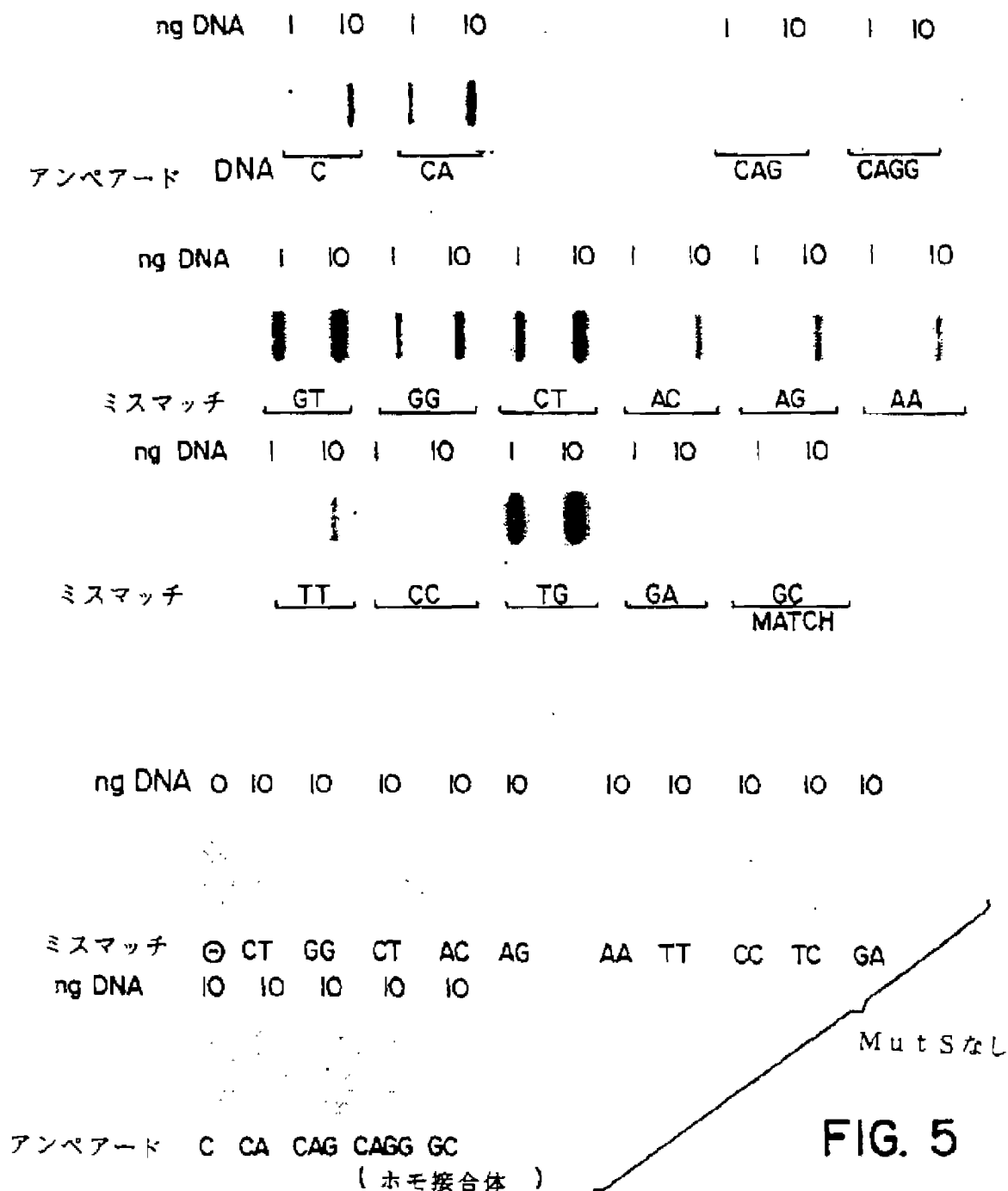
[Drawing 4]

<u>Type</u>	<u>Nucleotide Sequence</u>	<u>SEO ID NO:</u>
ホモ二本鎖 :	GCACCTGACTCCTGGGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACCCCTCTTCAGACGGCA	1 3
G:T ミスマッチ :	GCACCTGACTCCTGGGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACTCCTCTTCAGACGGCA	1 2
T:G ミスマッチ	GCACCTGACTCCTGTGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACGCCTCTTCAGACGGCA	6 7
C:T ミスマッチ	GCACCTGACTCCTGCGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACTCCTCTTCAGACGGCA	8 2
G:G ミスマッチ	GCACCTGACTCCTGGGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACGCCTCTTCAGACGGCA	9 10
A:G ミスマッチ	GCACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACGCCTCTTCAGACGGCA	11 12
G:A ミスマッチ	GCACCTGACTCCTGGGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACACCTCTTCAGACGGCA	1 13
A:C ミスマッチ	GCACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACCCCTCTTCAGACGGCA	14 3
A:A ミスマッチ	GCACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGA GGACACCTCTTCAGACGGCA	15 16
T:T ミスマッチ	GCACCTGACTCCTGTGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACTCCTCTTCAGACGGCA	17 2
C:C ミスマッチ	GCACCTGACTCCTGGCGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACCCCTCTTCAGACGGCA	18 3
アンベアード C	GCACCTGACTCCTGGCGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACC CCTCTTCAGACGGCA	19 3
アンベアード CA	GCACCTGACTCCTGGCAGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACC CCTCTTCAGACGGCA	20 3
アンベアード CAG	GCACCTGACTCCTGGCAGGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACC CCTCTTCAGACGGCA	21 3
アンベアード CAGG	GCACCTGACTCCTGGCAGGGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACC CCTCTTCAGACGGCA	22 3

FIG. 4

[Drawing 5]





[Translation done.]

(10) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-504699

(43) 公表日 平成9年(1997)5月13日

(51) Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	
C 1 2 Q 1/88		9453-4B	C 1 2 Q 1/88	A
C 0 7 H 21/04		8615-4C	C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 K 14/195		9358-4H	C 0 7 K 14/195	
		9358-4H	17/04	
G 0 1 N 33/566		0276-2J	G 0 1 N 33/566	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 47 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-513451  
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)11月4日  
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)5月7日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US94/12768  
 (87) 国際公開番号 WO95/12689  
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)5月11日  
 (31) 優先権主張番号 08/147,785  
 (32) 優先日 1993年11月4日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 シーン チェック、インク、  
 アメリカ合衆国、コロラド 80525、フォ  
 ート コリンズ、ホーストゥース ロード  
 400 E.  
 (72) 発明者 ワグナー、ロバート イー、ジュニア、  
 アメリカ合衆国、コロラド 80525、フォ  
 ート コリンズ、ホーストゥース ロード  
 400 E.  
 (74) 代理人 弁理士 加藤 朝道

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変異及び多型性の検出、増幅されたDNAサンプルの精製、及び対立遺伝子の同定のための、固定化ミスマッチ結合蛋白質の使用

## (57) 【要約】

一塩基変換、又は約1〜4塩基対の付加若しくは欠失のような変異を検出するための方法は、一塩基ミスマッチ又は不対塩基を有する核酸ハイブリッドに結合する、MutSのような固定化されたDNAミスマッチ結合蛋白質の使用を基礎とし、これにより、ヌクレオチドシーケンスにおける一塩基変換程度の小さな変異を含む変異の検出が可能となる。このような方法は、種々の重要な病気の状態又は病気に対する感受性を診断し、変異した癌遺伝子の存在を検出するのに有用であり、また、PCR増幅されたDNAサンプル内のエラー含有分子のようなミスマッチを含有する二本鎖DNA分子をアフィニティークロマトグラフィーにより単離又は除去するのに有用である。本発明はまた、本発明の方法を実施するのに有用なキットを提供する。

BEST AVAILABLE COPY

## 【特許請求の範囲】

1. サンプルの標的ポリヌクレオチドの非変異シーケンスから変異を検出するための方法であって、

(a) ミスマッチ含有ポリヌクレオチド分子が固体支持体に固定化されたミスマッチ結合蛋白質に結合する条件下において、前記サンプル由来の検出可能に標識されたポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドと、前記固定化ミスマッチ結合蛋白質と、をともにインキュベートすること、及び

(b) 前記ミスマッチ結合蛋白質に対する、前記サンプル由来のいずれかのミスマッチ含有ポリヌクレオチドの結合を検出すること、

を含み、

前記ミスマッチ結合蛋白質に結合し、検出可能に標識されたポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの存在が、前記標的ポリヌクレオチドのシーケンスにおける変異を示すこと

を特徴とする方法。

2. 前記ミスマッチ結合蛋白質が、Mut S 蛋白質又はMut S 蛋白質の機能的誘導体であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

3. 前記固体支持体が、天然セルロース、修飾セルロース、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、

デキストラン、ナイロン、ポリアクリルアミド、及びアガロースからなる群から選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

4. 前記固体支持体がニトロセルロースメンブランであることを特徴とする請求項3に記載の方法。

5. 前記検出可能に標識されたポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドが、色原体化合物、化学発光化合物、生物発光化合物、蛍光化合物、又は放射能標識で標識されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

6. 前記検出可能に標識されたポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドがビオチンで標識されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

7. 前記標的ポリヌクレオチドがDNAであることを特徴とする請求項1に記載

の方法。

8. サンプル内の二本鎖標的哺乳類ポリヌクレオチドの非変異シーケンスから変異を検出するための方法であって、

(a) 前記サンプル内のいずれかの二本鎖ポリヌクレオチドを変性させて一本鎖とし、該一本鎖を再アニーリングして二本鎖とすること、

(b) (i) ミスマッチ結合蛋白質に結合可能な、検出可能に標識されたミスマッチ含有オリゴヌクレオチドの存在下、又は

(ii) ミスマッチ結合蛋白質が、検出可能

に標識されたミスマッチ含有オリゴヌクレオチドとともに予備インキュベートされており、該ミスマッチ含有オリゴヌクレオチドに結合されているという条件下、

のいずれかにおいて、変性され再アニーリングされたステップ(a)の前記二本鎖と、固体支持体上に固定化された前記ミスマッチ結合蛋白質と、をともにインキュベートすること、及び

(c) 前記ミスマッチ結合蛋白質に結合した、検出可能に標識されたミスマッチ含有オリゴヌクレオチドの量を検出すること、

を含み、

前記サンプルの前記二本鎖哺乳類ポリヌクレオチドにおける変異の存在が、ミスマッチ結合蛋白質に対する、前記検出可能に標識された(ミスマッチ含有)オリゴヌクレオチドの結合の減少を生ずること

を特徴とする方法。

9. 前記固体支持体が、天然セルロース、修飾セルロース、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、ポリアクリルアミド、及びアガロースからなる群から選択されることを特徴とする請求項8に記載の方法。

10. 前記固体支持体がニトロセルロースメンブランであることを特徴とする請求項9に記載の方法。

11. 増幅されたDNAサンプルから、増幅過程の間

に導入された、少量のシーケンス又はシーケンスエラーを含むシーケンスを除去するための方法であって、

(a) 前記増幅されたDNAサンプルを変性状態に置き、次いで、少量のシーケンス又はエラー含有シーケンスがミスマッチ含有DNA二本鎖を形成するよう再アニーリングを行って、ミスマッチの二本鎖を含有する混合物を製造すること、

(b) ミスマッチの二本鎖が固定化ミスマッチ結合蛋白質に結合するよう、ステップ(a)の前記混合物と、前記固定化ミスマッチ結合蛋白質と、をともにインキュベートすること、及び

(c) 前記増幅されたDNAサンプルから、ミスマッチ含有DNAが結合した前記固定化ミスマッチ結合蛋白質を除去すること、

を含み、

シーケンスエラーを含む前記シーケンスを除去すること

を特徴とする方法。

12. 増幅されたDNAのサンプルの複対立遺伝子系において、特定の対立遺伝子を同定するための方法であって、

(a) 変性条件下において、前記特定の対立遺伝子のDNAシーケンスに完全に相補的な検出可能に標

識されたオリゴヌクレオチドプローブと、過剰量の増幅されたテストDNAと、を混合し、次いで、変性及びアニーリングした後前記プローブの各々の複製が二本鎖DNAにおいて見出されるようにアニーリングすること、

(b) 全てのミスマッチ含有DNAが固定化ミスマッチ結合蛋白質上に保持されるように、ステップ(a)で形成された前記混合物と、過剰量の前記固定化ミスマッチ結合蛋白質と、をともにインキュベートすること、

(c) 前記増幅されたテストDNAから、いずれかの(any) ミスマッチ含有DNAと結合している前記固定化ミスマッチ結合蛋白質を除去すること、及び

(d) 前記固定化ミスマッチ結合蛋白質が除去されたサンプルにおいて、前記検出可能に標識されたプローブの存在を検出すること、

を含み、

前記サンプル内の標識されたDNAの存在が、前記プローブが前記テストDNAにおける対立遺伝子に完全に相補的であることを示すこと

を特徴とする方法。

13. サンプル内の標的ポリヌクレオチドシーケンスの非変異シーケンスから変異を検出するのに有用な、中に一つ以上の容器を受け入れるのに適合したキ

ットであって、

(a) 固定化可能なミスマッチ結合蛋白質を含有する第1の容器と、

(b) 前記ミスマッチ結合蛋白質を固定化することができる固体支持体を含有する第2の容器と、

(c) 前記ミスマッチ結合蛋白質に対する、検出可能に標識されたミスマッチ含有核酸二本鎖の結合を検出することができる試薬を含有する第3の又は複数の容器と、

を含むことを特徴とするキット。

14. サンプル内の標的ポリヌクレオチドシーケンスの非変異シーケンスから変異を検出するのに有用な、中に一つ以上の容器を受け入れるのに適合したキットであって、

(a) 固体支持体上に固定化されたミスマッチ結合蛋白質を含有する第1の容器と、

(b) 前記ミスマッチ結合蛋白質に対する、検出可能に標識されたミスマッチ含有核酸二本鎖の結合を検出することができる試薬を含有する第2の又は複数の容器と、

を含むことを特徴とするキット。

15. 前記ミスマッチ結合蛋白質が、MutS又はMutSの機能的誘導体であることを特徴とする請求項13に記載のキット。

16. 前記ミスマッチ結合蛋白質が、MutS又はMutSの機能的誘導体であることを特徴とする請求項14に記載のキット。

17. 前記固体支持体が、天然セルロース、修飾セルロース、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、ポリアクリルアミド、及びアガロースからなる群から選択されることを特徴とする請求項13に記載のキット。

18. 前記固体支持体がニトロセルロースメンブランであることを特徴とする請求項17に記載のキット。

19. 前記固体支持体が、天然セルロース、修飾セルロース、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、ポリアクリルアミド、及びアガロースからなる群から選択されることを特徴とする請求項14に記載のキット。

20. 前記固体支持体がニトロセルロースメンブランであることを特徴とする請求項19に記載のキット。

21. 固定化されたミスマッチ結合蛋白質がミスマッチ含有ポリヌクレオチド分子に結合することが可能であることを特徴とする固体支持体上に固定化されたミスマッチ結合蛋白質。

22. Mut S蛋白質又はMut S蛋白質の機能的誘導体であることを特徴とする請求項21に記載の固定化されたミスマッチ結合蛋白質。

## 【発明の詳細な説明】

### 発明の名称

変異及び多型性の検出、増幅されたDNAサンプルの精製、及び対立遺伝子の同定のための、固定化ミスマッチ結合蛋白質の使用

### 発明の背景

#### 技術分野

分子生物学及び医学の分野における本発明は、野生株DNAにおける一塩基変換、又は一塩基の付加若しくは欠失程度のわずかな変異を含有する変異を検出するための方法に関し、更に増幅されたDNAの単位からミスマッチ含有DNAを除去するための方法に関する。

#### 技術的背景

ヒト分子の及び医学的な遺伝学の発達は、変異及びシーケンスの多型性の有効な及び正確な検出に依存し、これらの大多数は、一塩基の置換並びに小さな付加若しくは欠失から生じる。サンプル内における特定の変異又は変異核酸シーケンスの存在を検出することが可能なアッセイは、病気の予知及び診断、法医学、

流行病学、及び公衆の健康のために本質的に重要である。このようなアッセイは、例えば、個人における変異遺伝子の存在を検出し、該個人が遺伝病にかかるであろう可能性を判断するのに用いられ得る。細胞の癌遺伝子における個々の変異は細胞から癌細胞への形質転換を導く癌遺伝子の活性化を引き起こし得るという発見 (Nishimura, S. et al., Biochem. J. 243: 313-327 (1987); Bos, J. L., Cancer Res. 49: 4682-4689 (1989)) に伴い、癌の早期の検出又は癌に対する感受性の発見という点において変異を検出する能力は、重要性を増している。

このようなアッセイの利用性及び応用可能性を増加させたいという要求は、アッセイの感度の他、複雑さ及びコストによりしばしばわずらわされる。従って、DNAの変化 (alteration) の検出のための、より感度のよい、簡単な、及び相対的に安価なアッセイを開発することが強く要望される。

核酸欠失アッセイは、サイズ、シーケンス、制限エンドヌクレアーゼによる



分解に対する感受性等のような、核酸分子の一群の特性のいずれかを基礎とすることができる。このようなアッセイの感度は、観察者に対して検出信号が報告される又はシグナルを送られる様式を変えることにより、増加され得る。このように、例えば検出され得るように標識された試薬を用い

て、アッセイの感度を増加させることができ、該標識としては、酵素 (Kourilsky et al., U.S. Patent 4,581,333)、ラジオアイソトープ (Falkow, et al., U.S. Patent 4,358,535; Berninger, U.S. Patent 4,446,237)、蛍光標識 (Albarella et al., EP 144914)、化学標識 (Sheldon III et al., U.S. Patent 4,582,789; Albarella et al., U.S. Patent 4,563,417)、修飾塩基 (Miyoshi et al., EP 119448)、等がある。

一つ又は数種の塩基からなる遺伝子変化の検出の試みを図る大抵の方法は、標準の核酸 (DNA又はRNA) と、テストDNAと、の間の、変異がヘテロ二本鎖における誤対又は不對の塩基として表現されるハイブリッド形成を含む方法である。これらの誤対又は不對の塩基の検出は、種々の方法により達成されている。ミスマッチは、ミスマッチの部位における二本鎖の一方又は両方の鎖を切断する酵素 (RNase A, Mut Y) により検出されている (Myers, R.M. et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:275-284(1986); Gibbs, R. et al., Science 236:303-305(1987); Lu, A.S. et al., 1992, Genomics 14:249-255(1992))。ミスマッチのない二本鎖は切断されない。放射能で標識された核酸フラグメントを用いてテストDNAとアニーリングすることにより、テストDNAにおいて変異が存在する時、これらの酵素を用いて特定のサイズ

のフラグメントを産生することが可能である。該フラグメントはポリアクリルアミドゲル電気泳動により切断されていないフラグメントから区別される。これらの方法の主要な問題は、これらがRNAの使用を必要としたり (RNase法)、制限された数のミスマッチのみしか検出することができない (Mut Y法) ことである。

ミスマッチ含有DNA二本鎖は、変性ゲル電気泳動によっても完全にマッチし

た二本鎖から区別される。この系において、ミスマッチ含有DNAがミスマッチのない相同二本鎖より容易に変性する条件下で、二本鎖は変性勾配のポリアクリルアミドゲル上を移動されるので、該2種類の二本鎖は異なる距離移動する。感度が高く正確であるこの方法は、極めて手間がかかり、高レベルの技術的複雑さを要求する。

変異検出の2つの他の方法は、ミスマッチが存在する時の、DNAのフラグメントの伸長又は接合の欠如によるものである。両方法は、正確に問題の変異部位において終了する標準DNAオリゴヌクレオチドを用いることを要求し、テストDNAとアニーリングした時、ミスマッチの部分は前記オリゴヌクレオチドの最終塩基となる。ミスマッチ検出は、(a) ミスマッチ末端塩基を有するオリゴヌクレオチドを伸長させるDNAポリメラーゼの能力の欠如、又は(b) 2つのオリゴヌクレオチド間の接合部位にミスマッチがある時の、該2つのオリゴヌクレオチドを接合させるDNAリガーゼの能力の欠如、のいずれかに依存する。フラグメントの長さはゲル電気泳動により決定される。入力オリゴヌクレオチドより長いフラグメントの存在は、テストDNAにおいて、ミスマッチ、例えば変異が存在しないことを示す。これらの方法も幾分か手間がかかり、変異の正確な位置が知られていることを必要とし、サンプルDNAが問題の変異に関するヘテロ接合体である時には解釈が難しくなる。従って、これらは多型性をスクリーニングするのに用いるのに実用的でない。

リゴヌクレオチド間の接合部位にミスマッチがある時の、該2つのオリゴヌクレオチドを接合させるDNAリガーゼの能力の欠如、のいずれかに依存する。フラグメントの長さはゲル電気泳動により決定される。入力オリゴヌクレオチドより長いフラグメントの存在は、テストDNAにおいて、ミスマッチ、例えば変異が存在しないことを示す。これらの方法も幾分か手間がかかり、変異の正確な位置が知られていることを必要とし、サンプルDNAが問題の変異に関するヘテロ接合体である時には解釈が難しくなる。従って、これらは多型性をスクリーニングするのに用いるのに実用的でない。

ミスマッチのあるDNAの切断の化学的方法 (cotton, R.G, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397-4401(1988); Cotton, R.G., Nuc. Acids Res 17:4223-4233 (1989)) は、数種の薬剤、特に酸化オスミウム (VIII) 及びヒドロキシルアミンを用いた、DNA-DNAヘテロ二本鎖のミスマッチ部位における化学的切断を基礎とする。この方法において、DNAプローブは、関心のDNAの制限酵素切断により調製される。関心のシーケンスを含むプラスミドDNAは(端を標識された又は<sup>32</sup>Pで内部に標識された) 標識されたプローブDNAとハイブリッド形成される。ヒドロキシルアミンはミスマッチのシトシンを化学修飾する；酸化オ

スミウム (VIII) はミスマッチのチミンを修飾する。その後、ビペリジンを用いて修飾部位においてDNAを切断し、次に、切断産物を同定するために、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 及びオートラジオグラフィーを行う。この方法は、全ての可能な一塩基対を検出するという利点があると言われる。なぜなら、この方法はミスマッチの近傍におけるマッチした塩基対における切断も結果として生じるからである。

カスキーの研究室の公開公報 (Caskey, C.T. et al., 欧州特許公開公報第333,465(9/20/89); Grompe, M et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5888-5892(1989)) は、ミスマッチ切断反応のためのテンプレートとして、PCRで増幅されたcDNAを利用する変異を局在化する方法を開示する。この技術は、変異の位置を決定するためにオルニチントランスカルバモイラーゼ (OTCase) 欠失患者を研究することに首尾よく適用された。

クンら (Kung et al., 米国特許第4,963,658号公報) は、それ自身が $\beta$ -D-ガラクトシダーゼのような標識に結合することができるトポイソメラーゼ又はDNA巻き戻し蛋白質のような、高親和性の一本鎖DNA (ssDNA) 結合蛋白質との結合によるssDNAの検出を開示する。

#### ミスマッチ修復系及びミスマッチ結合蛋白質

DNAミスマッチ修復系は、ミスマッチ含有DNAを認識してこれと結合する、ミスマッチ結合蛋白質 (MBP) と称される蛋白質を含む蛋白質のファミリーを用いる。論文としては、Radman, M. et al., Annu. Rev. Genet. 20:523-538(1986); Radman, M. et al., Sci. Amer., August 1988, pp.40-46; Modrich, P., J. Biol. Chem. 264:6597-6600(1989)を参照。大腸菌ミスマッチ修復系の成分としてMutS蛋白質を同定した。例えば、Lahue, R.S. et al., Science 245:160-164(1988); Jiricny, J. et al., Nucl. Acids Res. 16:7843-7853(1988); Su, S.S. et al., J. Biol. Chem. 263:6829-6835(1988); Lahue, R.S. et al., Mutat. Res. 198:37-43(1988); Dohet, C. et al., Mol. Gen. Genet. 206:181-184(1987); 及び Jones, M. et al., Genetics 115:605-610(1987)を参照。Salmonella typhimuriumのMutS (Lu, A.L. et al., Genetics 118:593-600(1988); Haber L.T. et al., J. Bacteri

ol.170:197-202(1988); Pang, P.P. et al., J. Bacteriol. 163:1007-1015(1985) 及び *Streptococcus pneumoniae* の hex A 蛋白質 (Priebe S.D. et al., J. Bacteriol. 170:190-196(1988); Haber et al., 前掲) を含む他のバクテリア種において、類似蛋白質は公知である。

精製された Mut S 蛋白質は誤対塩基を含む DNA

に結合するが、ミスマッチのない DNA 又は一本鎖の DNA には結合しない。Mut S-DNA 相互作用は、DNA のいかなる分解又は修飾も生じない。変異検出アッセイの一部として、又は増幅された DNA サンプルからミスマッチの DNA を除去することを目的として、MBP 又は固定化された MBP を用いる可能性を開示する上述の参照はない。

#### 発明の概要

本発明者は、(1) 遺伝子変異又はゲノムの多型性の検出、(2) 増幅過程において導入された、汚染しているシーケンス、又はエラーを含むシーケンスを除去することによる、増幅された DNA サンプルの精製、及び(3) 複対立遺伝子系における特定の対立遺伝子の同定、のための、固定化されたミスマッチ結合蛋白質 (MBP)、例えば大腸菌の Mut S 蛋白質の使用について考案した。

血液細胞、腫瘍組織、培養中の細胞、その他いずれの組織をも含むいずれのソースからも、解析される核酸、好ましくは DNA を得ることができ、ヒトを含むいずれの種からもそれを得ることができる。比色、化学発色、又は放射能マーカーを用いて、公知である種々の方法のいずれによっても DNA を標識することができる。実際は、テスト DNA を標識する必要は全く

ない。

変異及び多型性を検出するために、標識された競合的オリゴヌクレオチドと共にアッセイを行うことができる。増幅された DNA を精製するためには標識は必要ない。対立遺伝子の同定のためには、合成された一本鎖オリゴヌクレオチドプローブにおいて標識が必要である。

本発明の方法は、テスト DNA を変性させ、それを再アニーリングすることに

より表現されるテストDNAにおけるミスマッチの発生に依拠する。テストDNAサンプルにおいてヘテロ接合性又は多型性をテストする場合、一本鎖が他の親染色体由来の鎖と再アニーリングする時、該テストDNAは、単に自己アニーリングして、ミスマッチの形態となり得る。ヘテロ接合が存在しないなら、ミスマッチは形成されないであろう。この場合、増幅において用いられるプライマーにおいて標識を行うことができ、増幅が必要でないならテストDNAの末端に標識を付加することができる。

DNA又は少量のシーケンス種の増幅の間に導入されたエラーを含むシーケンスを除去するために、同様の手順及び標識スキームが用いられる。これらの場合において、MBPに結合しない材料は、回収され、ミスマッチのない二本鎖シーケンスのみを含む。従って、これらのシーケンスは、増幅された集団 (po

pulation) における多数量 (majority) のシーケンスが極めて豊富化される。出発材料が一つのシーケンスのみを含む場合、結合しない材料は、出発材料と同一のシーケンスを含み、一方、増幅において導入されたエラーを含むシーケンスは、比較的まれである限り、固定化されたMBPにより保持されるミスマッチを形成している。

ホモ接合体の変異を検出するためには、公知の野生株のシーケンスの存在下で、テストDNAとアニーリングすることが必要である。このようなシーケンスは、人工的に合成されるか、増幅の前に、出発材料に公知の野生株のシーケンスを添加することにより増幅の間に製造され得る。公知の野生株のシーケンスの存在下でアニーリングを行う場合、アッセイによりホモ接合体及びヘテロ接合体の変異を検出する。

対立遺伝子の同定のためには、増幅の後、標識された一本鎖のプロープDNAをテストDNAに添加する必要がある。前記プロープのシーケンスは、関心の該対立遺伝子のDNAとアニーリングする時ミスマッチが形成されないよう対立遺伝子と同一である必要がある。任意の他の対立遺伝子のDNAとアニーリングされた時でもミスマッチを形成するように、プロープのシーケンスは選択され

る。テストDNAが、(テストDNAはプローブシーケンス全てが二本鎖を形成するようアニーリングされるような過剰量として)このようなプローブとアニーリングされ、過剰量の固定化されたMBPに曝される時、結合していない標識の存在は、テストDNAサンプルにおいて問題の対立遺伝子が存在することを示す。

このように、本発明は、サンプル内における標的ポリヌクレオチド、好ましくはDNAの非変異シーケンスから変異を検出する方法に関し、該方法は、

(a) ミスマッチ含有ポリヌクレオチド分子が、固定化された蛋白質に結合する条件下において、サンプル由来の検出可能に標識されたポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドと、固定化されたミスマッチ結合蛋白質と、をインキュベートすること、

(b) ミスマッチ結合蛋白質に対する、サンプル由来のいずれかの (any) ミスマッチ含有ポリヌクレオチドの結合を検出すること、

を含み、

これにより、ミスマッチ結合蛋白質に結合し、検出可能に標識されたポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの存在が、標的ポリヌクレオチドのシーケンスにおける変異を示すことを特徴とする。

本発明はまた、サンプル内の二本鎖の標的哺乳類ポリヌクレオチドの非変異シーケンスから変異を検出

する方法を提供し、該方法は、

(a) サンプル内のいずれかの (any) 二本鎖ポリヌクレオチドを変性 (一本鎖化denature) させた後、DNA鎖を再アニーリングすること、

(b) (i) MBPに結合することができる、検出可能に標識されたミスマッチ含有オリゴヌクレオチドの存在下、又は

(ii) MBPが共に予備インキュベートされており、検出可能に標識されたミスマッチ含有オリゴヌクレオチドに結合されているという条件下

のいずれかにおける、ステップ (a) の、変性され再アニーリングされた二本鎖ヌクレオチドと、固体支持体上に固定化されたミスマッチ結合蛋白質と、を共にインキュベートすること、

(c) ミスマッチ結合蛋白質に結合した、検出可能に標識されたミスマッチ含有オリゴヌクレオチドの量を検出すること、

を含み、

これにより、サンプルの二本鎖の哺乳類ポリヌクレオチドにおける変異の存在が、ミスマッチ結合蛋白質に対する、前記検出可能に標識された (ミスマッチ含有) オリゴヌクレオチドの結合の減少を生ずることを特徴とする。

上述の方法において好ましいMBPは、大腸菌Mu

tS蛋白質又はその機能的誘導体である。

ミスマッチ結合蛋白質が固定化される好ましい支持体としては、これに限定されないが、修飾セルロース、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、ポリアクリルアミド、及びアガロースがある。最も好ましい固体支持体はニトロセルロースメンブランである。

上述の方法において、検出可能に標識されたポリマー又はオリゴヌクレオチドのための好ましい検出可能な標識はビオチンである。

本発明は、増幅されたDNAサンプルから、増幅過程の間に導入された、少量量のシーケンス又はエラーを含むシーケンスを除去するための方法を提供し、該方法は、

(a) 増幅されたDNAを変性条件に置き、次いで、少量量のシーケンス又はエラー含有シーケンスがミスマッチ含有DNA二本鎖を形成するよう再アニーリングを行って、ミスマッチの二本鎖を含有する混合物を製造すること、

(b) ミスマッチ含有二本鎖がMBPに結合するよう、ステップ (a) の混合物と、固定化されたミスマッチ結合蛋白質と、を共にインキュベートすること、及び

(c) 増幅されたDNAサンプルから、ミスマッチ

含有DNAが結合している固定化されたMBPを除去すること、  
を含み、

これにより、シーケンスエラーを含むシーケンスを除去すること  
を特徴とする。

更に他の形態として、増幅されたDNAのサンプル中の複対立遺伝子系において、特定の対立遺伝子を同定する方法を提供し、該方法は、

(a) 変性条件下において、過剰量の増幅されたテストDNAと、特定の対立遺伝子のDNAシーケンスに完全に相補的な検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブと、を混合し、次いで、変性及びアニーリングした後前記プローブの各々の複製が二本鎖DNAにおいて見出されるようにアニーリングすること、

(b) 全てのミスマッチ含有DNAが固定化されたMBP上に保持されるように、過剰量の固定化されたMBPとステップ(a)の混合物とを共にインキュベートすること、

(c) 増幅されたテストDNAから、いずれかの(any) ミスマッチ含有DNAと結合している前記固定化されたMBPを除去すること、

(d) 固定化されたMBPが除去されたサンプルに

において、検出可能に標識されたプローブの存在を検出すること、  
を含み、

これにより、前記サンプル内の標識されたDNAの存在が、前記プローブが前記テストDNAにおける対立遺伝子に完全に相補的であることを示すことを特徴とする。

上述の方法において、固定化されたMBPは、(a) 遠心により除去し得る形態で、又は(b) カラム流出液にはミスマッチ含有二本鎖が存在しないようにカラム支持材料内に固定化されて、又は(c) 濾液にはミスマッチ含有二本鎖が存在しないようにフィルター支持体上に固定化されて存在することができる。

本発明は、サンプル内の標的ポリヌクレオチドシーケンスの非変異シーケンスから変異を検出するのに有用な、その中に一つ以上の容器を受け入れるのに



適したキットにも関し、該キットは、

- (a) 固定化可能なミスマッチ結合蛋白質 (MBP) を含む第1の容器と、
  - (b) MBPを固定化することができる固体支持体を含む第2の容器と、
  - (c) ミスマッチ結合蛋白質に対する、検出可能に標識されたミスマッチ含有核酸ハイブリッドの結合を検出することができる試薬を含む第3の容器又は複数の容器と、
- を含むことを特徴とする。

本発明はまた、サンプル内の標的ポリヌクレオチドシーケンスの非変異シーケンスから変異を検出するのに有用な、その中に一以上の容器を受け入れるのに適したキットにも関し、該キットは、

- (a) 固体支持体上に固定化されたミスマッチ結合蛋白質を含む第1の容器と、
  - (b) ミスマッチ結合蛋白質に対する、検出可能に標識されたミスマッチ含有核酸ハイブリッドの結合を検出することができる試薬を含む第2の又は複数の容器と、
- を含むことを特徴とする。

上述のキットにおいて、前記MBPは好ましくはMutS又はその機能的誘導体である。固体支持体は、好ましくは、天然のセルロース、修飾セルロース（最も好ましくはニトロセルロース）、又はポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、ポリアクリルアミド、及びアガロースからなる群から選択される。

本発明はまた、固体支持体上に固定化されたミスマッチ結合蛋白質、好ましくはMutS蛋白質又はその機能的誘導体であって、該固定化されたミスマッチ結合蛋白質はミスマッチ含有ポリヌクレオチド分子に結

合することができることを特徴とするミスマッチ結合蛋白質を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、ニトロセルロースに結合したMutSを用いたミスマッチの直接的な

アッセイの結果を示す。ビオチン化されたミスマッチ含有DNA（上2ライン）又はミスマッチのないDNA（下2ライン）を量を増加しつつ反応混合液に添加した。

図2は、ニトロセルロースに結合したMutS蛋白質を用いたミスマッチ二本鎖の競合アッセイの結果を示す。非標識のミスマッチ含有30量体（上2ライン）又はミスマッチのない30量体（下2ライン）を量を増加しつつ、ビオチン化されたミスマッチ含有30量体に添加した。図の右端のカラムはMutSを含有しないウェルを表す。

図3は、ニトロセルロース上に固定化された大腸菌mutSに対するミスマッチ含有DNAの結合の結果を示す。ホモ二本鎖が明るいバンド（又はバンドがない）を示す濃度において、ミスマッチ含有DNA二本鎖（2157及びBio-Het+）は暗くなっている（又は目に見えるバンド）を示す。

図4は、15又は16の位置に一つのミスマッチがある、又は15及び16の位置の間に1～4の不對塩

基対のある、合成オリゴヌクレオチド（30量体）のヌクレオチドシーケンスを示す。ミスマッチの又は不對の塩基をボールドで示す。これらのミスマッチ又は不對塩基対を検出する研究の結果を図5に示す。

図5は、ニトロセルロース上に固定化された大腸菌mutSに対する、表示されたミスマッチ又は不對塩基対を含むDNA二本鎖の結合の結果を示す。

#### 好ましい実施形態の説明

本発明者は、DNAシーケンスの一塩基変換、又は数種のこのような塩基変換を検出するための、広く適用することができる、比較的簡単な方法を考案した。この方法は、変異DNAの鎖及び野生株DNAの”相補的な”鎖が対合する時のミスマッチ含有ヘテロ二本鎖の形成に依拠する。

ミスマッチの存在は、大腸菌のMutS蛋白質のような固定化されたミスマッチ結合蛋白質（MBP）にDNAを最初に結合させることにより極めて特異的な様式で検出される。MBPに結合したDNAの存在は、その後、用いる標識に応じて、またアッセイが直接アッセイ又は競合アッセイのいずれかにより、多くの

方法のいずれにおいても検出される。この方法は、不對塩基対において、又はその近傍においてDNAを切断することができるミスマッチ切断ヌクレアーゼ酵素を

用いる従来の方法と全く対照的である。

本書面に開示される方法は、(a)簡便性、(b)正確性、(c)放射能なしで用いることができること、(d)全ての一塩基置換変異、及び1～4の塩基の付加変異又は欠失変異を検出することができること、の利点を有する変異/多型性 (polymorphism) 検出システム (ないし方法) を提供する。

標準的な参照は、先の、組換えDNA技術及び細胞生物学の一般的な原理を用いており、単離の条件及び核酸の取り扱い、核酸の変性及びアニーリング、ハイブリッド形成アッセイ、及びこれらに類似のものを開示し、以下のものを含む； Sambrook, J. et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Albers, B. et al., MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, 2nd Ed., Garland Publishing, Inc., New York, NY, 1989; Watson, J.D., et al., MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE, Volumes I and II, Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., Menlo Park, CA, 1987; Darnell, J.E. et al., MOLECULAR CELL BIOLOGY, Scientific American Books, Inc., New York, NY, 1986; Lewin, B.M., GENES II, John Wiley & Sons, New York, NY, 1985、これらの参照文献は、その全体において引照をもって本書面

に組み込まれている。

MBPは、約100kDaの蛋白質であり、バクテリア及びより高度な生物から同定、単離され、ミスマッチ塩基を含むDNAに選択的に結合する。MBPは、イースト (Valle G et al., 1991 Yeast 7:981-988; Miret J. J. et al., 1993, J.Biol.Chem. 268:3507-3513) の他、ヒト (Stephenson, C. et al., 1989, J. Biol.Chem. 264:21177-21782; Karran, P et al., 1990, Mutat. Res. 236:269-275; Hughes M.J. et al., 1992, J.Biol.Chem. 267:23876-23882; Reenan, A.G. et al

., 1993, *Genetics* 132:963-973; Reenan, A.G. et al., 1993, *Genetics* 132:975-985) において発見されている。アフリカツメガエル及びマウス由来のミスマッチ結合蛋白質は、ラドマン (M.Radman) らによりクローニングされている。

好ましいMBPは、誤対又は不對塩基を含むDNA-DNA (又はDNA-RNA又はRNA-RNA) 二本鎖に結合し、一本鎖ポリヌクレオチド又は完全にマッチした二本鎖を顕著に除外すること (exclusion) により特徴づけられる。好ましい形態として、大腸菌由来の完全に天然のMutS蛋白質が用いられる。しかしながら、本書面に用いられる、“ミスマッチ結合蛋白質”又は“MBP”という言葉は、完全に天然の蛋白質の機能的誘導体をも包含することを意図する。

“機能的誘導体”は、本発明に従い利用することができるミスマッチ含有核酸ヘテロ二本鎖に結合する能力を有する“フラグメント”、“変異体”、“類似体 (アナログ)”、又は“化学的誘導体”を意味する

MBPの“フラグメント”は、分子のいかなるサブセット、即ちより短いペプチドをも意味する。蛋白質の“変異体”は、全体の蛋白質又はそのDNAハイブリッド結合フラグメントのいずれかと実質的に類似した分子を意味する。ミスマッチ結合蛋白質、例えばMutSの変異体は、当該技術でよく知られた組換えDNA法により調製され得る。

MutSの好ましい機能的誘導体は、*Salmonella typhimurium*のMutS蛋白質 (Lu, A.L. et al., 前掲; Haber L.T. et al., 前掲; Pang, P.P. et al., 前掲) 又は*Streptococcus pneumoniae*のhexA蛋白質 (Priebe S.D. et al., 前掲; Haber et al., 前掲) のような、他の種における大腸菌MutSの同族体である。加えて、ヒト、マウス、カエル、又はハムスターのDNAにおいて同定される相同のシーケンスによりコードされる同族体のような、MutS又はHexAの可能な真核生物の同族体も用いることができる (Shimada, T. et al., *J. Biol. Chem.* 264:20171(1989); Linton, J. et al., *Molec. Cell. Biol.* 7:3058-3072(1989); Fujii, H. et al., *J. Biol. Chem.* 264:10057(1989))。

MBPの化学誘導体は、融合蛋白質におけるものとしてのアミノ酸の付加的な伸長を含む、蛋白質の標準的な構成物でない付加的な化学的モイエティ (moieties: 対をなす2つの要素) を含む。ペプチドの共有結合修飾は、本発明の範囲内に含まれる。選択された側鎖又は末端の残基と反応することができる有機誘導化剤を、蛋白質内の標的アミノ酸残基と反応させることにより、このような修飾が分子内に導入され得る。

本発明の方法のために有用なMBPとなる蛋白質の選択において、アッセイは、慣習的な方法を用いて当業者により行われ得る。このように、例えば、本発明において有用なMBPの存在についてサンプルを評価する場合、(その全体が本書面に引照により組み込まれる) ジリクニーら (Jiricny et al.) により Mut S について開示されるような、ミスマッチ結合アッセイを行うことができる。好ましくは、フィルター結合アッセイが用いられる。オリゴヌクレオチドヘテロ二本鎖を調製するために、オリゴヌクレオチド、好ましくは約16塩基は、キナーゼ反応を用いた $^{32}$ P、及びT4-ポリヌクレオチドキナーゼのようなキナーゼを用いた $\gamma$ - $^{32}$ P-ATPで標識される。その後、(-20℃で貯蔵され得る) 5'-標識されたオリゴヌクレオチドは、標準的な条件下で、一塩基対のミスマッチを有する相補的なオリゴヌクレオチドとアニーリン

グされる。アニーリングされた16塩基対のヘテロ二本鎖は、テストされ、30分間氷上で保存された過剰量の蛋白質と混合される。その後該混合物は、アッセイ緩衝液において、予備的湿潤されているニトロセルロースフィルターにアブライされる。数秒間ゆるやかに吸引し、前記フィルターを冷たく冷やしたアッセイ緩衝液で十分に洗浄する。前記フィルターは、その後空気乾燥され、シンチレーション溶液に懸濁されカウントされる。蛋白質がフィルターに付着するため、フィルター上のいかなるカウントも推定されるMBPとの結合に帰結し得る。このような蛋白質がない場合、標識されたオリゴヌクレオチドヘテロ二本鎖はフィルターを素通りする。このように、このような簡単なアッセイを用いることにより、本発明の方法に有用なMBPを検出及び選択することができる。

本発明に用いられるものとして、MBPは固体支持体又は担体に固定化される

。” 固体支持体” 又は” 担体” は、蛋白質に結合することができるいかなる支持体をも意味する。公知の支持体又は担体としては、天然セルロース、ニトロセルロースのような修飾セルロースないしセルロース誘導体 (modified)、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、ポリアクリルアミド、及びアガロース、又は Sepharose (登録商標) がある。磁気ビ

ーズも有用である。支持体材料は、固定化されたMBPが標的核酸分子に結合することができる限り、実質的にいかなる可能な構造的形状をも有することができる。このように、支持体の形状は、テストチューブ、マイクロティタープレートなどのような反応容器の内部表面に、微粒子、ビーズ、多孔体、及び不浸透性ストリップ、及びメンブランを含むことができる。好ましい支持体は、ニトロセルロースディスク又はストリップを含む。当業者は、MBPとの結合に適した多くの担体を知っており、日常的な実験によりこれらを確かめることができるであろう。

最も好ましいのは、MBPが共有結合又は非共有結合で付着又は固定されるような固体支持体である。好ましくは、非共有結合付着が、適した安定性と強い吸着力とを提供する方法を用いた吸着によることである。ミスマッチ含有DNAに結合するMBPの能力が破壊されない特定の固体支持体に適した、当該技術で公知である方法を用いて、MBPは固定化される。

その後、固定化されたMBPは、ヘテロ接合性 (多型性) の他、一塩基置換を検出すること、又は混合物からミスマッチ含有DNAを単離すること、又は混合物からミスマッチ含有DNAを除去することに容易に用いられる。

一つの実施形態において、ポリスチレン又は他のプ

ラスチックのマルチウェルプレートの表面は、固体支持体として役立つ。更に他の形態において、MBPが結合する固体支持体は、マルチウェルプレートのウェルの底に付着される。

好ましい実施形態において、固定化及びDNA結合は、96ウェルプロッティ

ング装置において行われ、その後のニトロセルロース（又は他の支持体）紙のシートは、反応を評価するために取外し得る。例えば、ニトロセルロース上の発色現像は、検出系の一部としての酵素、及び発色反応の前駆体として役立つ酵素の色原体又は化学発色の基質を基礎とした結合を評価するのに用いられ得る。

支持体へのMBPの付着に続いて、当該技術において公知である方法又は試薬を用いて、蛋白質又は核酸の更なる結合を防止するための処理（"ブロック"）がなされる。

固定化されたMBPは、小さなオリゴヌクレオチドヘテロ二本鎖分子と接触され、そして（飽和するまで）結合させられる。オリゴヌクレオチドは、好ましくは約30塩基対である。テストのため、MBPにより良好に認識される（即ち結合する）ミスマッチを含むDNA二本鎖が用いられる。

ミスマッチを含有する又はこれを欠如するオリゴヌク

#### レオチドの調製

検出し得る標識で5'末端を修飾されたヌクレオチドを用いて、このようなオリゴヌクレオチドは調製されるので、それらは、適した検出法、好ましくは分光測光法又は化学発光法により検出され得る。好ましい形態において、オリゴヌクレオチドはビオチン修飾され、ビオチンと高親和性で結合するアビジン又はストレプトアビジンを基礎とした検出系を用いて検出することができる。ストレプトアビジンは、酵素に結合することができ、該酵素の存在は色原体基質を用いて検出され、発色現像により測定される。

本発明の方法において有用な酵素の例は、西洋ワサビのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ふどう球菌ヌクレアーゼ、デルターV-ステロイドイソメラーゼ、イーストアルコールデヒドロゲナーゼ、 $\alpha$ -グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコアミラーゼ、及びアセチルコリンエステラーゼである。

検出し得る標識は、ガンマカウンター又はシンチレーションカウンターの使用

により、又はオートラジオ

グラフィーにより、検出され得るラジオアイソトープでもあり得る。

検出可能な標識は蛍光化合物でもよい。蛍光標識された分子が適した波長の光に曝される時、その後の、顕微鏡又は蛍光分析法を用いた蛍光により、その存在が検出され得る。最も一般的に用いられる蛍光標識化合物としては、フルオレセインイソチオシアン酸、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアヒド、及びフルオレサミンである。

検出可能な標識は、 $^{152}\text{Eu}$ 又は他のランタノイド系列のような蛍光放射性金属でもよい。これらの金属は、ジエチレントリアミン五酢酸又はエチレンジアミン四酢酸のような金属キレート群を用いてオリゴヌクレオチドに付着させることができる。

検出可能な標識は、化学発光化合物であってもよい。化学発光で標識された分子の存在は、後の、化学反応の過程で起こる発光の存在を検出することにより決定される。特に有用な化学発光標識化合物の例としては、ルミノール、イソルミノール、サロマチックアクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、及びシュウ酸エステルである。

同様に、生物発光化合物をオリゴヌクレオチドの標識に用いてもよい。生物発色は、触媒蛋白質が化学発

光反応の効果を増加させるような生物学的系において見出される化学発光の型のものである。生物発光蛋白質の存在は、発光の存在の検出により決定される。標識する目的のために重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、及びエクオリンである。

DNA-DNA、DNA-RNA、又はRNA-RNAハイブリッドに結合したMBPは、直接的又は間接的のいずれかにより検出され得る。直接的な検出においては、ポリマー又はオリゴヌクレオチド二本鎖は、本書面で議論されるような標識を用いて検出可能に標識される。

間接的な検出においては、アッセイは、既に結合した又は同時に曝されるミス



マッチ含有二本鎖のテストDNAのMBPに対する結合の競合を利用する。このように、標識されたミスマッチ含有オリゴヌクレオチドは、MBPに予備結合されるか、MBPとテストDNAと共にインキュベートされる。テストサンプルにおいてより多くのミスマッチを含有するDNAがあれば、MBPに対する標識されたオリゴヌクレオチドの結合はより少なく発生するであろう。

アッセイすべきテストサンプルは、関心のいかなる培地にも入れることができ、一般的に、医学的、獣医学的、栄養学的、又は工業的な重要性のあるサンプルであるであろう。核酸が調製され得る細胞を含む、ヒ

ト及び動物の試料及び体液は、本方法により特にアッセイされ得る。好ましいソースとしては、血液、血清、他の組織、ミルク、尿、脳脊髄液、唾液、糞便物、肺吸引物、咽喉拭き取り物、生殖器の拭き取り物及び侵出物、直腸拭き取り物、及び鼻咽頭吸引物がある。

#### ヘテロ接合体又は多型性の検出

二倍体生物由来のDNAのヘテロ接合体又は多型性を検出するために、テストDNAは、好ましくは、二倍体生物由来のPCRで増幅されたDNAを変性し、アニーリングすることにより調製される。前記テストDNAは、標識されたプライマーで調製され、アニーリングされ、そして、ミスマッチのオリゴヌクレオチドに既に結合している固定化されたMBPを含有するウェル又は他の反応容器に添加される。代わりに、テストDNAをミスマッチのオリゴヌクレオチドに混合することができ、該混合物を固定化されたMBPを含むウェル又は他の容器に添加することができる。

分光光度の読みとりは、テストDNAの定量検出に適した波長で行われる。(1) 固定化されたMBPに対するテストDNAの結合、又は(2) 固定化されたMBPからのミスマッチのオリゴヌクレオチドの置き換え、のいずれかを行うのに適した時間、インキュベーションを行った後、前記DNA溶液は除去され、ウ

ェルは洗浄されて、分光光度の読みとりが、結合したミスマッチオリゴヌクレオチドの定量検出に適した波長において行われる。

ミスマッチオリゴヌクレオチドの読みとりに対するテストDNAの読みとりの割合は、広範囲のDNA濃度において、ミスマッチ含有テストDNAとミスマッチのないテストDNAとで大きく異なるであろう。アッセイの前にテストDNAを定量する必要がないように、ホモ接合体又はヘテロ接合体としてのテストDNAの特質を許容するDNAの公知の量を用いて、標準曲線が作成される。このように、一本鎖DNAサンプルは、ヘテロ接合体を決定するのに十分であり、単一の96ウェルマイクロプレートにより、少なくとも約80種のDNAサンプルをテストすることができる。

#### ホモ接合体の検出

ホモ接合体変異を検出するために、公知のホモ接合体野生株DNAは、変性及びアニーリングの前に、テストDNAサンプルと組み合わせなければならない。変異を含むテストDNA（ホモ接合体）のみが、固定化されたMBPへの結合についてミスマッチオリゴヌクレオチドと拮抗し得るミスマッチ含有DNAを形成するであろう。

本発明の方法は、(a) 標識されたミスマッチオリ

ゴヌクレオチドのみ、又は(b) 標識されたテストDNAのみ、とともに用いられ得る。しかしながら、両方のこれらの方法は、核酸濃度が決定されており、いくつもの異なるテストDNA濃度においてテストが行われなければならないことを必要とする。

ミスマッチオリゴヌクレオチドが標識されている場合、テストは、テストDNAのいくつもの (several) 異なる濃度との競合と、ミスマッチ及び非ミスマッチの標準について、(二本鎖分子のモル数として表される濃度と共に) この結果の曲線と標準曲線との比較と、を基礎とする。

テストDNAが標識される場合、テストは、飽和と、ミスマッチ及び非ミスマッチの標準について、結果の曲線と標準曲線との比較と、において、いくつもの濃度のMBPへの結合の範囲を測定することに関する。

#### 増幅されたDNAサンプルの精製

近代の分子生物学において一般に用いられる最も革新的かつ広範に用いられる

技術は、ほとんど検出することができないほど微量な出発量からDNAシーケンスを増幅させる、ポリメラーゼ鎖反応（PCR）の方法である。PCRの文献としては、Mullis, K.B., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263-273; Saiki, R.K. et al., 1985, Bio/Technology 3:100

8-1012; 及びMullis, K.B. et al., 1987, Meth. Enzymol. 155:335-350を参照。加えて、PCRは特定のシーケンスを増幅させることができるため、特定のシーケンスの精製を、基本的に一つのステップで、ゲノムDNAから行うことができる。PCRは、ヒトゲノムの事実上全ての研究の本質的な構成要素であり、遺伝子の同定及びクローニングの中心的な構成要素であり、遺伝病及び感染症の診断にますます用いられており、裁判においても広く用いられている。

しかしながら、種々の応用、特に遺伝子クローニング及び変異検出において、PCRは、合成中に間違った非相補的な塩基の挿入による誤りを発生するポリメラーゼの固有の傾向がある。生体内のほとんどの複製ポリメラーゼの忠実度は、 $10^{10}$ 複製塩基毎に1つの誤った塩基のみを挿入する程度であるが、PCRに用いられるポリメラーゼは、ほぼ $10^4$ 複製塩基毎に1つの誤った塩基のエラー率であり得る。この高いエラー率は、増幅された分子の重要なフラクションが出発材料とシーケンスにおいて同一でないであろうことを意味する。

本方法は、増幅過程により導入される少量（minority）シーケンス、及びシーケンス交替を含む分子を除去するための固定化されたMBPを用いて、増幅されたDNAサンプルを精製するのに有用である。

例えば、20回の複製（増幅の一般的な量）でDNA断片が増幅されたなら、最終的な分子の有意のフラクションは、一つ又はそれ以上の誤った塩基を含む。クローニング実験において、このことは、出発シーケンスと異なるヌクレオチドシーケンスをクローニングする危険性を大きく増加させる。

PCRで増幅されたサンプルの変性（一本鎖化）及びアニーリングに関する変異検出アッセイにおいて、PCRで挿入された誤った塩基は、もとのサンプルにおける変異であるかように評価され得る。このように、正確な変異検出のために

は、PCRの複製エラーにより導入されるシーケンス交替とともに全てのDNA分子を評価する必要がある。本書面に開示される方法は、簡単で直線的な様式でこの精製を達成する。

固定化されたMBPは、増幅されたDNAサンプルを精製するのに用いられ得る。MBPは、固相支持体、好ましくはニトロセルロースフィルター、セファロースビーズ、又は磁気ビーズに結合することにより固定化される。前記フィルター又はビーズは、必要であれば、二本鎖DNAの結合を防ぐように処理される。増幅されたDNAサンプルは、熱処理により変性され、そして再アニーリングされる。PCRの誤りのランダム性により、アニーリングの後、ミスマッチ塩基対において事実上全ての誤った塩基が発見されるであろう。

固定化されたMBPをサンプルに添加し、静かに振とうすることにより溶液を混合する。固定化されたMBP及びいずれかの(any)結合したミスマッチ含有DNAは、用いた固体支持体の性質によって、例えば、フィルターを除去することにより、ビーズを溶液の外に沈殿させることにより、又はビーズを磁氣的に除去することにより、除去される。このことは、正確にマッチしたDNA二本鎖を残す。

増幅中に導入されるエラーを含む分子を除去することにより増幅されたDNAサンプルを精製することに加え、固定化されたMBPを用いる精製は、イムノグロブリンのシーケンスのように、分岐した(diverged)、反復のあるDNAシーケンスを試験する場合に多数量(majority)のシーケンスを豊富にするのに用いられる。

(シーケンスの点で、)混合された集団(population)のDNAから増幅されたサンプルから少数種を完全に除去するために、本書面に開示されるような1回(round)より多い精製と、できる限り1回より多い増幅を行うことも必要であろう。

ヘテロ接合体サンプルにおける親シーケンスの半分は、同じ親シーケンス由来物の相補的な鎖とアニーリングされ、ミスマッチのない分子を形成するから、ホモ接合体及びヘテロ接合体の両方の増幅されたシー

クエンスからシークエンスを精製するのに、本方法を用いることができることに注目されたい。換言すると、出発材料がヘテロ接合体である場合、アニーリングされた分子の半分は、出発シークエンスにおける違いのためミスマッチを含有するので、サンプルから除去される。しかしながら、アニーリングされた分子の半分はこのようなミスマッチを含有しないから、それらは、増幅の間のエラーの結果として製造されるミスマッチを含む場合にのみサンプルから除去される。いずれにしても、変異検出アッセイは、第2回目の変性及びアニーリングを必要とするであろう。

#### 複(multi)対立遺伝子系における対立遺伝子同定

より多くの病原遺伝子の対立遺伝子が同定されるに従い、及びヒトゲノムの多型性マップを発展させる探求目的において、所与の遺伝子の特定の対立遺伝子を同定することができることがますます重要になっている。固定化されたMBPは、対立遺伝子同定の簡単な方法を提供する。

所与の遺伝子の各々の対立遺伝子のために、特有の、標識されたオリゴヌクレオチドプローブが、該プローブは1つの対立遺伝子だけに完全に相補的のように調製される。即ち、該プローブは、誤った対立遺伝子と対になった時に1つ又はそれ以上のミスマッチを形成

するように、調製される。前記プローブは過剰量の増幅されたテストDNAと混合され、変性及びアニーリングの後、該プローブの各々の複製は二本鎖において見出されるであろう。問題の各々の対立遺伝子についてのプローブを用いて、本過程は繰り返される。アニーリングされたDNA混合物は、その後、

(1) 遠心により懸濁液から除去され得る支持体上に固定化されたMBPと混合されるか、

(2) 適当なカラム支持体上に固定化されたMBPのマイクロカラムを通されるか、

(3) 固定化されたMBPを含有するフィルター支持体を通されるか、  
のいずれかが行われる。いずれの場合においても、固定化されたMBPは、全てのミスマッチ含有DNAが保持されるような過剰量でなければならない。上澄み

液、カラム流出（貫流）液、又は濾液は、標識の存在について解析される。プローブがテストDNAにおいて対立遺伝子に完全に相補的である場合のみ、標識が検出されるであろう。

一本鎖のプローブのシーケンスが存在しないことを確かめるためには、固定化されたMBPの代わりに、支持体上に数種の一本鎖DNA結合要素を含むことが、必要であり得る、又は少なくとも要求され得る。この系は、ホモ接合体又はヘテロ接合体条件において同様

な良好さで機能する。

#### キット

本発明はまた、本書面に開示される方法を実施するのに有用なキット又は試薬（ないしユニット）系に関する。このようなキットは、本書面に開示される方法に従うアッセイを行うのに要求される本質的な要素を含有する試薬の組み合わせを含む。前記試薬系は、テスト装置の形状において試薬の適合性が許容するであろう組成物又は混和物として、又はより典型的にはテストキット、即ち、必要な試薬を保持する一つ以上の容器、装置等、及び通常アッセイの実施のために記載された解説書を含む、バックされた組み合わせとして、商業的にパッケージされた形態で提供される。本発明のキットは、本書面に開示される種々のアッセイの形態を実施するためのいかなる形態及び組成物をも含む得る。

いずれの場合においても、試薬系は、（１）固定化し得る又は固定化されたMBP又はその機能的誘導体、好ましくはMutSと、（２）アッセイを行う上で有用な付加的な試薬と、を含む。前記キットは標識されたミスマッチ含有オリゴヌクレオチドを任意で含んでもよい。特定の変異を検出するために、キットは、PCRを行うための標識されたプライマーも含むことが

できる。本発明に従うキットは、そこで固定化されたMBPへの二本鎖の結合が行われる溶液の構成要素のような、補助的な化学製品を付加的に含むことができる。

広範囲に記載された本発明について、実例で提供される以下の実施例を参照す

ることにより、本発明はより容易に理解されるであろう。但し、以下に明記されない限り、以下の実施例は本発明を限定することを意図するものではない。

#### 実施例 1

##### 固定化されたミスマッチ結合蛋白質によるミスマッチ含有DNAの結合

###### A. 材料と方法

###### 1. 固定化されたMBPの調製

ニトロセルロースシート (0.45  $\mu$ m, Schleicher & Schüll) を反応緩衝液 (20mM Tris pH7.6, 0.01mM EDTA, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM DTT) で湿潤させ、ドットプロット装置 (Bio-Rad) に配置した。

0.5  $\mu$ g / 10  $\mu$ l 反応緩衝液の濃度の精製されたMBP、大腸菌MutSを各々のウェルのニトロセルロース紙上にスポットした。該ウェルを室温でインキュベートし、残留液を真空 (吸引機) で吸引した。溶液をウェルに加えた後それを捨てることにより、各

々のウェルを100  $\mu$ lの反応緩衝液で2回洗浄した。第2回目の洗浄の後、残留液を真空で吸引した。

###### 2. ブロッキング

他の蛋白質又は核酸の結合を防ぐため、ニトロセルロースフィルターをウシ血清アルブミン (BSA) でブロックした。1% (w/v) BSAを含む反応緩衝液 (200  $\mu$ l) を各々のウェルに加えた。室温で1時間置いた後、溶液を捨て、溶液をウェルに加えた後それを捨てることにより、各々のウェルを100  $\mu$ lの反応緩衝液で2回洗浄した。第2回目の洗浄の後、残留液を真空で吸引した。

###### 3. オリゴヌクレオチド

これらの研究で用いられるオリゴヌクレオチドのシーケンスを、ヒト $\beta$ -グロビン ( $\beta$ -globin) 遺伝子の鎌状赤血球変異の部位を囲む30塩基の領域から得た。ミスマッチを形成するのに用いられた変異シーケンスは鎌状赤血球変異ではない (実際の鎌状赤血球変異はA:T→T:A転換である) が、ミスマッチは鎌状赤血球変異の部位にある。ビオチン化されたオリゴヌクレオチドを変異鎖

の5'末端においてビオチン化した。ビオチン修飾されたヌクレオチドをオリゴヌクレオチドの5'末端に添加することによる合成で

ビオチン化を行った。

G:Tミスマッチ

ミュータント GCACCTGACT CCTGGGGAGA AGTCTGCCGT [SEQ ID NO:1]

野生種 CGTGGACTGA GGACTCCTCT TCAGACGGCA [SEQ ID NO:2]

ミスマッチなし

ミュータント GCACCTGACT CCTGGGGAGA AGTCTGCCGT [SEQ ID NO:1]

ミュータント CGTGGACTGA GGACCCCTCT TCAGACGGCA [SEQ ID NO:3]

#### 4. DNAとの結合

1%BSAを含む20 $\mu$ lの反応緩衝液中のビオチン化オリゴヌクレオチドを各々のウェルに添加した。室温で30分間置いた後、残留液を捨てた。溶液をウェルに加えた後それを捨てることにより、各々のウェルを100 $\mu$ lの反応緩衝液で5回洗浄した。第5回目の洗浄の後、残留液を真空で吸引した。

#### 5. ストレプタビジン接合西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)との結合

ストレプタビジンの結合により、ビオチンの存在を検出した。1%BSAを含む反応緩衝液の濃度50mg/mlにおけるストレプタビジン接合HRP(Pierce Chemicals)の100 $\mu$ l量を各々のウェルに添加

した。室温で2時間置いた後、溶液を捨て、溶液をウェルに加えた後それを捨てることにより、各々のウェルを100 $\mu$ lの反応緩衝液で5回洗浄した。第5回目の洗浄の後、残留液を真空で吸引した。

#### 6. 強調化学発色(ECL) [Enhanced ChemiLuminescence登録商標]の現像

ニトロセルロースシートをドットプロット装置から除去し、ペトリ皿において10ml反応緩衝液で3回洗浄した。5mlのECL現像液(Amersham)をニトロセルロースに注いだ。この試薬におけるHRPの基質は化学発光化合物である



。1分間置いた後、溶液を除去した。ニトロセルロースをドライプロットティングし、2つの透明なプラスチックシートの間に置いた。このように保護されたニトロセルロースシートを種々の照射時間で暗所においてX線フィルムに晒した。本書面に報告される実験においては、露出時間は1分である。

## 7. 競合

競合研究において、一定量のビオチン化されたミスマッチ含有オリゴヌクレオチド (5 ng) と、種々の量の非標識DNAと、ミスマッチ含有又はミスマッチなしで、を混合し、ウェルに添加した以外は、DNA

結合は上述に開示される通りである。

## B. 結果

### 1. 固定化されたMBPによるミスマッチ含有DNAの特異的な結合

図1は、ビオチン化されたミスマッチ含有DNA (上2ライン) 又はミスマッチのないDNA (下2ライン) の増加量を添加した (重複実験の) 結果を示す。

検出可能なミスマッチのない30量体は200 ngのDNAでさえ観察されなにもかかわらず、固定化されたMBPはミスマッチ含有30量体の0.2 ng程度の少量を検出することができた (下のスポットの周囲のラインは不完全な洗浄によるものである)。

### 2. 競合アッセイ

図2は、5 ngのビオチン化されたミスマッチ含有30量体に対する、非標識のミスマッチ含有30量体 (上2ライン) 又はミスマッチのない30量体 (下2ライン) の増加量の添加の (重複実験の) 結果を示す。50 ngのミスマッチ含有DNAにおいて競合が明らかに見られるが、全体においても、ミスマッチのないDNAは500 ngまで競合しなかった。図上の相当に明るいカラムはMBPを含まないものである。

少なくとも上述の実験で用いられた30量体での、

固定化されたMBPは少なくとも3オーダー (orders) の大きさの効果でミスマッチ含有DNAと完全に対であるDNAとの間を識別することが本結果より示され

た。H I VのV 3ループ由来のシーケンスで5 4量体を用いても、同様の結果が得られている。従って、完全に対となった二本鎖の量が増加するにつれて識別力が減少する時でさえ、ヒトゲノムの多型性の研究のために最大の有用な長さであると考えられる3 0 0量体を用いたときの識別効果は、1 0 0のオーダの配列においてであろう。

## 実施例II

### ヒトゲノムDNAにおけるヘテロ接合体の検出

上記に開示された方法を、ヒトゲノムDNAの特定位置におけるヘテロ接合体を検出するのに用いた。(グルタミンをコードする)コドン9 8から停止コドンに伸びるヒトグルコキナーゼ遺伝子のエクソン3の部分についてP C R増幅を行った(Soffel rt al., Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 89:7698-7702(1992))。エクソン3ヒトグルコキナーゼに相当する1 0 0塩基の野生型二本鎖シーケンス (SEQ ID NO:4 及び SEQ ID NO:5) は次の配列である。

```

5'   gcactaacttcaggggtgatgctggtgaagggtgggagaagg
3'   cgtgattgaagtcccactacgaccacttccaccctcttcc

      tgaggagggggcagtggagcgtgaagaccaaaccagatg
      actcctccccgtgacctcgcaacttctggttctggtgtctac

      tactccatccccgaggacgcc 3' (SEQ ID NO:4)
      atgaggtaggggctcctgcgg 5' (SEQ ID NO:5)

```

ヘテロ接合体DNA (下に示す) において、下線のC A GコドンのCをTに変異した。(1) この位置において公知であるヘテロ接合体、(2) この位置で公知であるホモ接合体、及び(3) この位置でそう推定されるホモ接合体、から得られたゲノムDNAから、テストされたDNAシーケンスはP C R増幅された。

テストDNAを、熱処理により変性し、再アニーリングし、大腸菌のMut Sを用いて本発明に従って固定化されたミスマッチ結合蛋白質アッセイにおいてそれらの結合をテストした。

#### A. 材料及び方法：

##### 1. P C R増幅

次のテンプレート（鋳型）を用いた：

- (a) グルコキナーゼ遺伝子エキソン3における2157-ヘテロ接合体
- (b) DGK-101-ヒトゲノムDNA（グルコキナーゼ遺伝子エキソン3におけるホモ接合体）

(c) (Sigma Chemical Co.より市販される) シグマDNAと呼ばれる（グルコキナーゼ遺伝子エキソン3と推定される）ヒトゲノムDNA，雄

(Operonより得た) プライマーはHPLCで精製され、2つのDNA鎖 SEQ ID NO:4及び SEQ ID NO:5の5'末端に相当する次のシーケンスである。

プライマー # 1 : 5' (biotin)-GCACTAACTTCAGGGTGATG

プライマー # 2 : 5' -GCGTCCTCGGGGATGGAGTA

PCRプライマー#1には、後述のECL検出系において検出され得るように5'末端に結合したビオチンを含ませた。使用されないプライマーを除去した後、種々の増幅産物の定量を行うために、プライマー#2を、5'-<sup>32</sup>P-リン酸で放射能標識した。プライマー#2を、増幅において使用する前に、キナーゼ反応を用いて<sup>32</sup>Pで標識した。キナーゼ反応混合物は、70mM Tris-HCl, pH7.6; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 5mM DTT; 20 $\mu$ M <sup>32</sup>P-ATP; 30ユニットT4ポリヌクレオチドキナーゼ; 及び500ngDNA（プライマー#2）を含有する。37℃で30分間、20 $\mu$ lの反応量でキナーゼ反応を行った。70℃で10分間、熱処理することによりキナーゼを不活性化した。DNAは、-20℃で保存した。

PCR反応は、10mM Tris-HCl pH8.3; 50mM KCl; 15mM MgCl<sub>2</sub>; 0.001%ゼラチン(W/V); 0.05mM dATP; 0.05mM dTTP; 0.05mM dGTP; 0.05mM dCTP; 0.1 $\mu$ Mプライ

マー#1; 0.075 $\mu$ M プライマー#2; 0.025 $\mu$ M <sup>32</sup>Pプライマー#2; 200ngテンプレートDNA; 及び2.5ユニット AmpliTaq DNAポリメラーゼ(Perkin-Elmer)を含有する。反応量は100 $\mu$ lである。90℃で1分間置いて変性させ、55℃で1分間置いてアニーリングし、72℃で2分間置いて伸長させることにより、パーキン-エルマーサーモサイクラー (Perkin-Elmer thermocycler) で30

サイクル、増幅を行った。製造者のプロトコルに従いセントリコン30マイクロコンセンレーター (Amicon) を用いた遠心透析により、使用されなかったプライマーを除去した。非変性8%ポリアクリルアミドゲル上に(放射能のcpmとして測定した)等量を添加し、臭化エチジウムで染色し、標準DNAと比較することにより、PCR産物を定量した。

2:固定化されたミスマッチ結合蛋白質のアッセイ:

以下のスケジュールに従い(パーキン-エルマーサーモサイクラーにおいて)DNAの変性及びアニーリングを行った:100℃で4分間; 50℃で1時間; 75℃で4分間; 50℃で30分間; 次に室温に冷却した。

ニトロセルロースシート(0.45mM, Schleicher and Schuell, BA85)を、反応緩衝液(20mM Tris-HCl, pH7.6; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 0.1mM DTT; 0.01mM EDTA)に浮かせることにより湿潤させ、スロットブロット装置(Hoefer Scientific Instruments)の3シートのプロッティング紙(Schleicher and Schuell GB002)に配置した。100μlの反応緩衝液を各々のウェルに加えた。室温に5分間置いた後、真空で残留緩衝液を吸引した。MutS(20μl反応緩衝液に500ng)を各々のウェルに加えた。同量の反応緩衝液を”MutSのない”ウェルに加えた。次のステップに進む前に、前記装置を20分間室温に放置した。

各々のウェルに200μlのHRPフリーのBSAを加えることにより、ニトロセルロースをブロックした。室温で1時間放置した後、残留溶液を真空で吸引した。

3%HRPフリーBSAを含む20μl反応緩衝液にDNA試料を添加した。室温で30分間放置した後、ウェルに溶液を添加した後それをデカンテーションすることにより、100μlの反応緩衝液でウェルを5回洗浄した。

ビオチンに対するストレプトアビジンの結合を視覚化することにより、ニトロセルロースシート上に結合したビオチン標識されたDNAの存在を検出した。3

%のHRPフリーのBSAを含む反応緩衝液中の100μlストレプトアビジン-HRPを各々のウェルに加えた。室温で20分間放置した後、残留溶液をデカ

ンテーションした。各々のウェルに溶液を添加した後それをデカンテーションすることにより、 $100\mu\text{l}$ の反応緩衝液でウェルを5回洗浄した。第5回目の洗浄の後、残留した溶液を真空で除去した。

### 3. 強調化学発色 (ECL) 現像

前記装置からニトロセルロースシートを除去し、小さなトレイにおいて50 ml 反応緩衝液で1分間づつ4回洗浄した。ニトロセルロースシートをドライプロットティングし、10 mlのECL現像液 (Amersham) に浸漬した。1分後、ニトロセルロースシートを除去し、ドライプロットティングして2つの透明なプラスチックシートの間に置いた。このように保護されたニトロセルロースシートを30分間、暗所でX線フィルムに曝した。

### B. 結果

結果を図3に示す。Bio-Hetとは、SEQ ID NO:1とSEQ ID NO:3との合成30量体二本鎖を意味する。この二本鎖は15の位置に

においてG:T mismatchesを含有する。Bio-Homoとは、15の位置に mismatchesのないSEQ ID NO:1とSEQ ID NO:2との合成30量体二本鎖を意味する。Bio-Hetは0.1 ng程度の少ない量で検出されるのに対して、Bio-Homoの結合は10 ngのDNAでさえ検出されなかった。Mut Sの欠如 ("no Mut S" カラム) において結合が観測されないことは、観測された全てのDNA結合がMut S依存であることを示す。

Mut Sに対するヘテロ接合体核酸 (2157) の結合は、0.6 ngにおいて明らかに見られた。(DNAのソースに依存しない) ホモ接合体の結合は1.25 ngにおいてかすかに検出することができ、2.5 ngにおいて明らかに検出された。このように、本アッセイにおいては、ヘテロ接合体DNAはホモ接合体DNAの少なくとも2~4倍良好に検出された。より高濃度におけるホモ接合体DNAの結合は、Taqポリメラーゼによる増幅の間に導入されるエラーの結果であると考えられた。このポリメラーゼによるヌクレオチドの取り込みにおけるこのような高いエラー率は、良く知られた現象である。このように、このような不適当な結合は、固定化されたMut Sによる mismatches結合をなお表現する

。

変異、ヘテロ接合体、又は多型性の検出のための固

定化されたミスマッチ結合蛋白質アッセイの使用は、PCR増幅の間のポリメラーゼエラーにより製造されるもののような、ランダムなミスマッチのない基質を提供する能力によってのみ限定される。

### 実施例III

固定化されたミスマッチ結合蛋白質による特定のミスマッチ及び不對塩基対の検出

ヘテロ二本鎖DNAにおける一塩基のミスマッチ及び1～4の不對塩基対を検出するための研究を行った。

15又は16の位置における一つのミスマッチ、又は15及び16の位置の間に1～4の不對塩基対を有するよう調製された合成オリゴヌクレオチド(SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、及びSEQ ID NO:3を含む30量体)をこれらの研究で利用した。これらのオリゴヌクレオチドのシーケンスを図4に示す。上述のように、これらのシーケンスは、鎌状赤血球貧血に重要な変異の領域のヒト $\beta$ -グロビンから得られ、極めてこれに近いものである。各々の二本鎖の1つの鎖のみが標識されるように、オリゴヌクレオチドを、(ECL検出系により検出され得るように)5'ビオチン標識で調製し、非標識オリゴヌクレオチドとアニーリングした。先の実施例にお

いて上記のように開示されるように、固定化されたミスマッチ結合蛋白質(MutS)を用いたミスマッチ検出アッセイにおいて、前記二本鎖を用いた。

TNE緩衝液(10mM Tris-HCl, pH8.0; 0.01M NaCl, 1mM EDTA)にオリゴヌクレオチドを希釈した。ビオチン標識されたオリゴヌクレオチドを10mg/ $\mu$ lに希釈し、非標識のオリゴヌクレオチドを100ng/ $\mu$ lに希釈した。等量の希釈されたオリゴヌクレオチドを混合し、70℃で10分間アニーリングし、室温で30分間放置した後、氷で急冷して-20℃で保存した。全てのビオチン標識された鎖が二本鎖となることを確実にするため、非標識のオリゴヌクレオチド

は10倍の過剰量とした。

結果を図5に示す。これらのアッセイにおいて、C : C及びG : Aを除く全てのミスマッチを検出した。T : C及びC : Aミスマッチは、この実験ではテストしなかった。必ずしも全ての検出されたミスマッチが等しく良好に検出されたわけではない。検出感度の順番は、

$$G : T > G : G > C : T > A : C > T : T > A : A = A : G > C : C$$

のようであった。

A : GミスマッチがG : Aミスマッチより良好に検出されたことは、個々の鎖のシーケンスが、少なく

とも本実験に用いられるもののような比較的短いオリゴヌクレオチドにおいてミスマッチの検出範囲（程度）に影響を与え得ることを示唆した。しかしながら、G : T及びT : Gミスマッチが等しく良好に検出されたことは、良好に検出されるミスマッチがストレインオリエンテーションに依存しないで検出されることを示唆する。

1～4の不对塩基対を有するヘテロ二本鎖も検出された。2つの不对塩基対を有するヘテロ二本鎖は、1つの不对塩基対を有するヘテロ二本鎖より容易に検出された。3つの不对塩基対を有するヘテロ二本鎖は、いずれの検出可能なミスマッチよりも検出しにくく、4つの不对塩基対を有するヘテロ二本鎖は更に検出しにくかった。

これらの結果は、固定化されたミスマッチ結合蛋白質アッセイは、一塩基変換による全ての変異を検出するであろうことを示す。このように、C : Cは検出されなかったが、C : Cミスマッチを有するいずれの変異体：野生型の対にも必然的に発生するこれに相当するG : Gミスマッチは容易に検出された。加えて、前記検出系は、1～3塩基対の付加による変異を容易に検出することができる。

以上に記載の参照文献は、明記して組み込まれるか

否かに拘わらず、引照により本書面に全て組み込まれている。

ここで十分に記載された本発明について、本発明の主旨及び範囲からはずれる

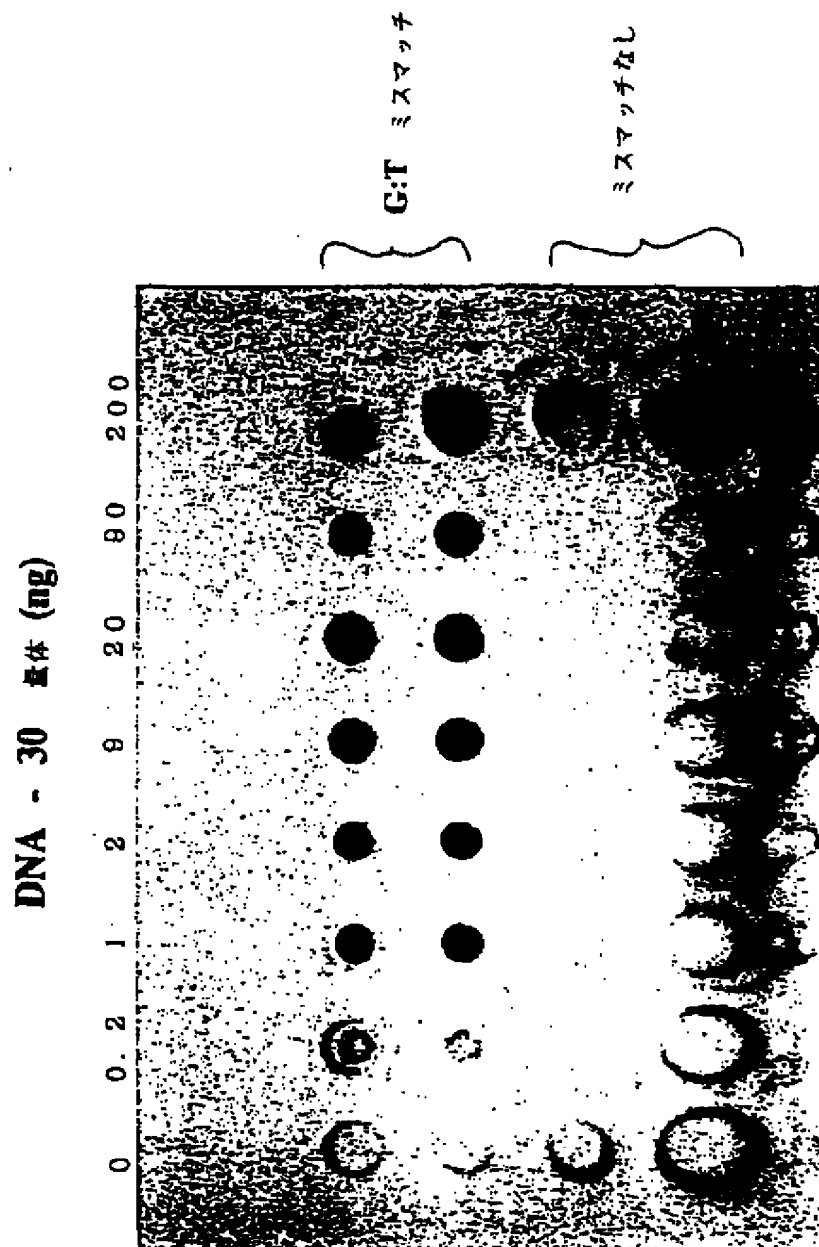
ことなく、及び不当に過度の実験をすることなく広範囲の同等のパラメータ、濃度、及び条件内で同様の事が実施できることは、当業者により十分に認められるであろう。

本発明はその特定の実施例に関連して開示されているが、それは更なる修正をすることができることが理解されるであろう。本出願は、全体として本発明の原理に従う、本発明のいかなるバリエーション、使用、又は適用を包含することを意図し、本発明が属する当該技術において公知又は慣習的な実施の範囲内で行われるような本開示からの新発展を含み、追記された請求の範囲に従うような上記に開示された本質的な特徴に適用し得る。



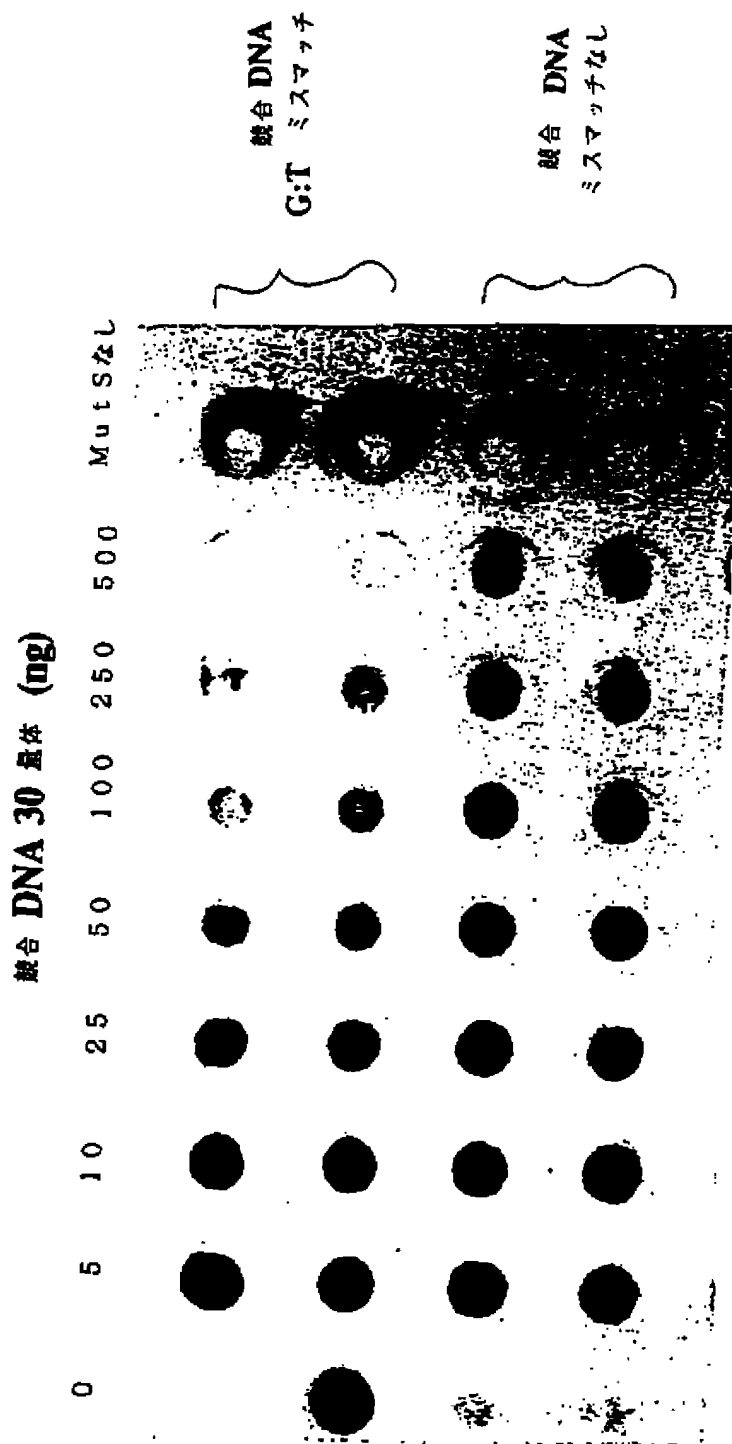
FIGURE 1

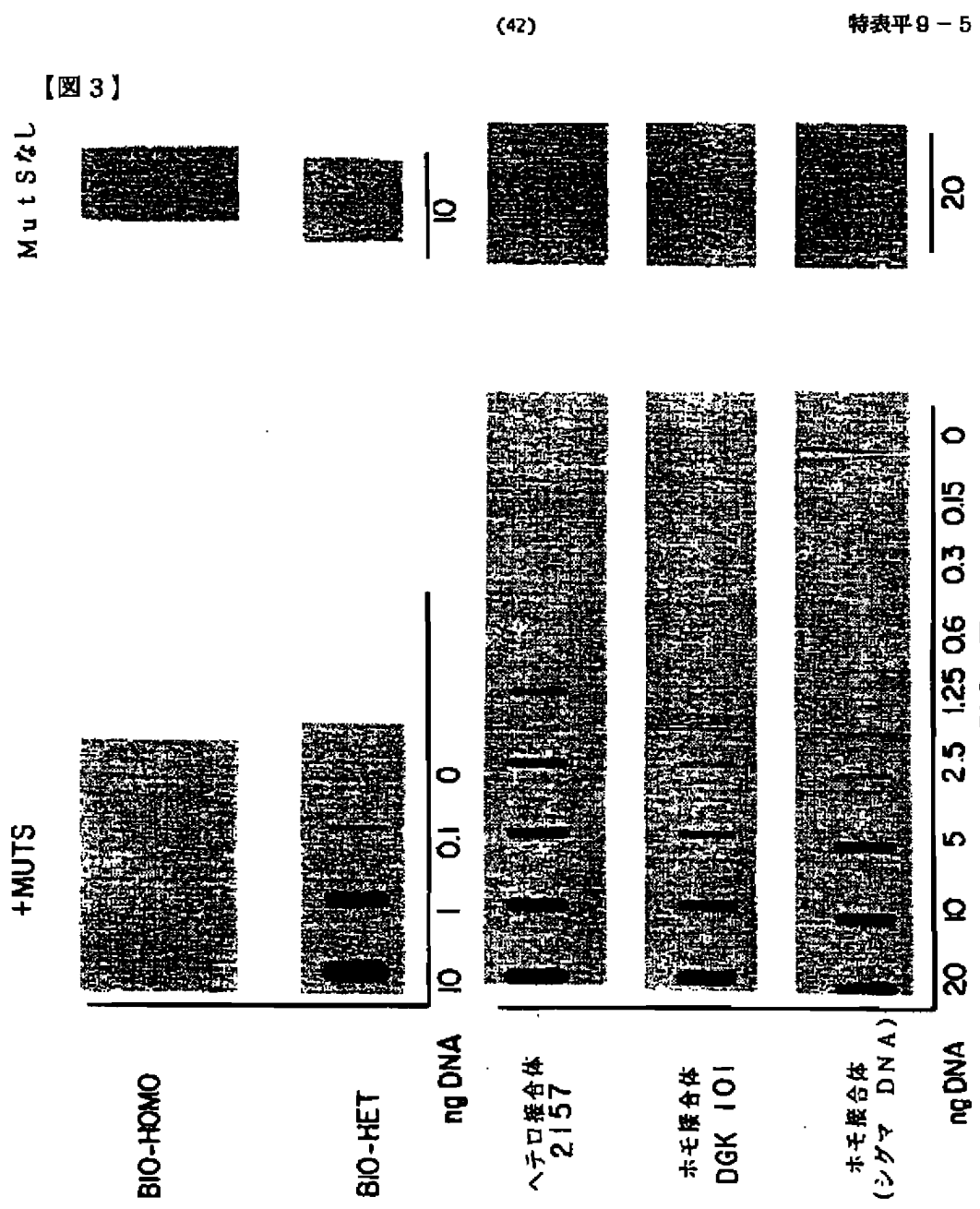
【図 1】



【図2】

FIGURE 2





【図 3】

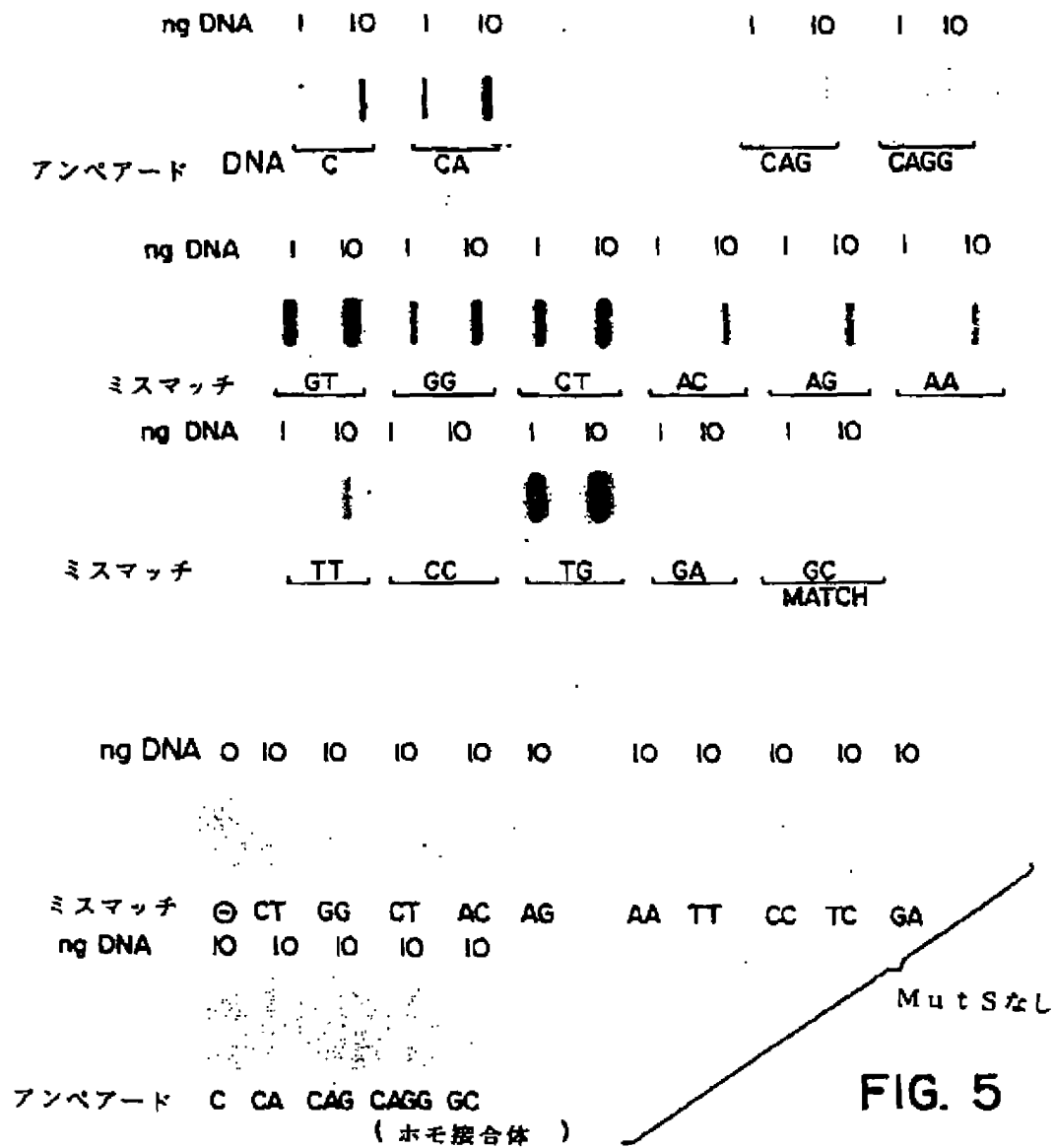
FIG. 3

【図4】

Type	Nucleotide Sequence	SEO ID NO:
ホモ二本鎖 :	GCACCTGACTCCTGGGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACCCCTCTTCAGACGGCA	1 3
G:T ミスマッチ :	GCACCTGACTCCTGGGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACTCCTCTTCAGACGGCA	1 2
T:G ミスマッチ	GCACCTGACTCCTGTGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACGCCTCTTCAGACGGCA	6 7
C:T ミスマッチ	GCACCTGACTCCTGCGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACTCCTCTTCAGACGGCA	8 2
G:G ミスマッチ	GCACCTGACTCCTGGGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACGCCTCTTCAGACGGCA	9 10
A:G ミスマッチ	GCACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACGCCTCTTCAGACGGCA	11 12
G:A ミスマッチ	GCACCTGACTCCTGGGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACACCTCTTCAGACGGCA	1 13
A:C ミスマッチ	GCACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACCCCTCTTCAGACGGCA	14 3
A:A ミスマッチ	GCACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGA GGACACCTCTTCAGACGGCA	15 16
T:T ミスマッチ	GCACCTGACTCCTGTGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACTCCTCTTCAGACGGCA	17 2
C:C ミスマッチ	GCACCTGACTCCTGGCGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACCCCTCTTCAGACGGCA	18 3
アンベアード C	GCACCTGACTCCTGGCGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACC CCTCTTCAGACGGCA	19 3
アンベアード CA	GCACCTGACTCCTGGCAGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACC CCTCTTCAGACGGCA	20 3
アンベアード CAG	GCACCTGACTCCTGGCAGGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACC CCTCTTCAGACGGCA	21 3
アンベアード CAGG	GCACCTGACTCCTGGCAGGGGAGAAGTCTGCCGT CGTGGACTGAGGACC CCTCTTCAGACGGCA	22 3

FIG. 4

【図5】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US94/12768

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) :C12Q 1/68; G01N 33/543, 33/544, 33/548, 33/566  
US CL :A35A6, 7.5; 436/501, 518, 528, 529, 530, 531, 536

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/6, 7.5, 975; 436/501, 518, 528, 529, 530, 531, 536

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, DIALOG

search terms: mismatch binding protein?, MUTS, MUT(w)S, assay, detect?, remov?, test

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Volume 16, Number 16, issued 1988, J. Jiricny et al, "Mismatch-Containing Oligonucleotide Duplexes Bound by the <i>E. coli</i> mutS-Encoded Protein", pages 7843-7853, see entire document.	13, 16, 17, 18 1-12, 14, 16, 19-22
Y	WO, A, 93/02218 (WAGNER ET AL.) 04 February 1993, see entire document.	1-12, 14, 16, 19-22
Y	AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, Volume 51, Number 4, issued October 1992, A. I. Lishanskaya et al, "Mutation Detection in the Cystic Fibrosis Gene Using an <i>E. coli</i> Mismatch Binding Protein, mutS", page A385, Abstract Number 1517, see entire abstract.	1-10, 12

☒ Further documents are listed in the continuations of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier document published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to its own disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not to conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 FEBRUARY 1995

Date of mailing of the international search report

23 FEB 1995

Name and mailing address of the ISA/US  
Commissioner of Patents and Trademarks  
Box PCT  
Washington, D.C. 20531

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

JAMES L. GRUN, PH.D.

Telephone No. (703) 306-0196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.  
 PCT/US94/12768

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES USA, Volume 91, issued March 1994, A. Lishanski et al, "Mutation Detection by Mismatch Binding Protein, MutS, in Amplified DNA: Application to the Cystic Fibrosis Gene", pages 2674-2678, see entire document.	1-22
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES USA, Volume 86, issued August 1989, R.K. Saiki et al, "Genetic Analysis of Amplified DNA with Immobilized Sequence-Specific Oligonucleotide Probes", pages 6230-6234, see especially page 6230.	12
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Volume 263, Number 14, issued 15 May 1988, S. Su et al, "Mispair Specificity of Methyl-Directed DNA Mismatch Correction <i>In Vitro</i> ", pages 6829-6835, see entire document, especially pages 6833-6834.	1-22

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	弁内整理番号	F 1	
// C 1 2 N 15/09		9162-4B	C 1 2 N 15/00	A

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ), AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, FI, GE, HU, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LT, LV, MD, MG, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN